

CONTRIBUTIONS TO EMBRYOLOGY

VOLUME III, Nos. 7, 8, 9



WASHINGTON, D. C.
PUBLISHED BY THE CARNEGIE INSTITUTION OF WASHINGTON
1915

CARNEGIE INSTITUTION OF WASHINGTON
PUBLICATION No. 223

11242

CONTENTS.

- No. 7. On the fate of the posterior cardinal veins and their relation to the development of the vena cava and azygos in the embryo pig. By FLORENCE R. SABIN (7 plates)..... 5-32
8. Recherches cytologiques sur la fécondation des Ascidiens et sur leur développement. Par J. DUESBERG (3 planches, 12 figures)..... 33-70
9. The histology of the poison-glands of *Bufo aqua* and its bearing upon the formation of epinephrin within the glands. By P. G. SHIPLEY and G. B. WISLOCKI (2 plates) 71-90

CONTRIBUTIONS TO EMBRYOLOGY, No. 7.

ON THE FATE OF THE POSTERIOR CARDINAL VEINS AND THEIR
RELATION TO THE DEVELOPMENT OF THE VENA
CAVA AND AZYGOS IN THE EMBRYO PIG.

By FLORENCE R. SABIN.

With seven plates.

CONTENTS.

Introduction	7	The general circulation of the Wolffian bodies....	17
Technique.....	7	Azygos and hemiazygos veins.....	18
General analysis of the primitive venous system	11	General survey.....	18
The veins of the Wolffian body.....	12	Circulation of a typical body-wall segment	
General survey of the veins.....	12	with relation to the azygos veins.....	20
The posterior cardinal vein.....	14	Origin and development of the azygos system	
The mesial cardinal vein.....	14	and the lower segment of the inferior vena	
The anterior mesial vein of the Wolffian body.....	15	cava from a prevertebral plexus.....	22
The ventral vein of the Wolffian body.....	15	Conclusions	29
The transverse veins of the Wolffian body		Bibliography	30
and the vena cava.....	15	Explanation of plates	31

ON THE FATE OF THE POSTERIOR CARDINAL VEINS AND THEIR RELATION TO THE DEVELOPMENT OF THE VENA CAVA AND AZYGOS IN THE EMBRYO PIG.

BY FLORENCE R. SABIN.

INTRODUCTION.

During a study of the lymphatic system in the pig, it became evident that a much more exact knowledge of the details of the development of the prevertebral veins was essential in order to trace the origin of the thoracic duct. A knowledge of the neighboring veins is more necessary for the study of the thoracic duct than for any of the superficial lymphatic trunks, since the latter can be so much more readily injected. Besides their relation to the lymphatic problem, the azygos veins have proven to be of great interest—on the one hand, in connection with their relation to the fate of the posterior cardinal veins, and on the other, in connection with the larger subject of the origin of the vena cava and the primitive veins of the body-wall.

In the course of this study it has been found that the posterior cardinal veins, which develop in the border of the Wolffian body, disappear entirely with that organ; and that the azygos veins are new prevertebral veins which develop in connection with the vertebrae and subsequently drain the blood from the spinal and intercostal veins as the posterior cardinal veins disappear. It has been shown that the inferior vena cava is not as complex in its development as has been thought. It develops primarily to drain the Wolffian bodies. It has a ventral segment and a dorsal, post-renal segment. The ventral segment comes from two primitive veins, namely, the omphalo-mesenteric and the mesial cardinal (subcardinal) veins. The dorsal segment comes from a prevertebral plexus. This prevertebral plexus is extensive and from it the following veins develop: the azygos and hemiazygos systems, the post-renal segment of the inferior vena cava, and the ascending lumbar veins. This study has been made possible through the use of two methods, first, the injection of the vascular system of embryos, and secondly, the clearing of total specimens, which we owe to Spalteholz.

TECHNIQUE.

The methods of injecting embryos have developed as follows: The first extensive description of the methods of injecting embryonic blood-vessels was given by Popoff in 1894, in a study of the blood-vessels of the yolk-sac of the chick. He did not make a study of the blood-vessels within the embryo. Popoff brought out the fact that notwithstanding the many studies on the blood-vessels of the yolk-sac, it had been impossible to make out the richness of the vascular net without injections. The technique which he developed is as follows: In general he used fine glass canulae to puncture the vessel. The canulae were made by drawing out soft glass tubing of a diameter of 0.5 mm., taking care that the tube should narrow rapidly to a point. To this canula was attached a rubber tube ending in a small mouthpiece. The pressure was made by blowing into the tube and the fluid used was an aqueous Prussian blue. The place of injection varied according to the stage of development and the area desired; the most difficult stages were the early ones before the marginal sinus was fully developed; from this time up to the fourth day the marginal sinus was

used, and Popoff noted that the injection mass might run with or against the blood-stream from the heart, according to the point of injection; he found also that part of the blood-vessels of the yolk-sac might be injected by the action of the heart driving the fluid through the aorta. In chicks, after the fourth day of incubation, Popoff injected directly into the aorta by means of a hypodermic syringe.

The history of the different methods of injecting embryos as they have developed in this laboratory may be of interest. The work was begun by Dr. Mall and has been continued by his pupils. At first the work was a direct development from the methods of making injections of the vascular system in adult animals, and this has been summarized by Dr. Flint (1900) in his article on the adrenal. After injecting the blood-vessels of the adrenal in the adult, Flint applied a similar technique to the vessels in fetal stages, namely, he tied a canula into the aorta and injected Prussian blue by means of a gravity flask. For younger stages, he tied a canula into the apex of the heart, and finally in still younger stages into the umbilical artery or vein. By this last procedure he succeeded in injecting embryos as small as 2.5 to 3 cm. in length.

The next step in the injection of the embryos came in my study of the lymphatic vessels of the skin, which were filled with Prussian blue by means of a fine hypodermic needle. Inasmuch as lymphatic vessels can seldom be seen, good results are only obtained by knowing the level of the lymphatic plexus in order to puncture the vessels. Extensive injections of the lymphatics in stages before the valves develop can best be made by considering the lines of growth, that is to say, by finding the position of larger trunks, which are the primary vessels of an area and which drain an extensive zone. In these studies it became necessary to get the relation of the lymphatics to the blood-vessels, and I found that by puncturing the liver directly with a syringe and filling it with fluid, an injection of the main arteries could be made by means of the heart-beat. Thus was emphasized the necessity of having fresh embryos with the heart still beating. During the same work (1902) I repeated Budge's injection of the extra-embryonal coelom and the tissue space connected with it. To make these injections I used a glass canula connected by means of a rubber tube to a pressure flask of a very low column of mercury. This is easily arranged by putting a little mercury into a U-tube, one end of which is attached through a rubber tube to the canula and the other to a rubber bulb which can be compressed by a screw-clamp. These injections were made with India ink, which flows more easily than Prussian blue, since it has a finer granule. This manipulation was watched under a compound microscope, a procedure which was first emphasized by W. G. MacCallum. Since then all injections of the young embryos have been made with the aid of the binocular microscope.

In 1905 Dr. Mall published a study of the development of the blood-vessels of the brain made from a series of embryos in which the injections were made either through the aorta or by a direct puncture of the liver. In this paper Dr. Mall analyzed completely the method of injecting the blood-vessels of the embryo through the liver, and showed that by this method either the main arteries or the main veins could be injected at will. To fill the arteries he injected a little ink into the liver and got their injection by means of the heart-beat. On the other hand, he obtained the main veins in a dead embryo by an over-distention of the liver. In these injections India ink was used.

Finally complete capillary injections were obtained by H. M. Evans. He found that by injecting India ink into the umbilical arteries with a hypodermic syringe, the needle being pointed toward the embryo, the entire capillary bed of the embryo could be filled. By the aid of this method Evans was able to demonstrate the validity of Thoma's theory

of the growth of blood-vessels by showing that the main arteries of the body could be traced to their antecedent plexuses.

In general embryos of medium size can be injected best with a hypodermic syringe. For these injections the chorionic sac should be opened immediately before the injection is made; until the amnion and chorion have fused the amnion should be left intact. To make the injections it is essential to see the vessels clearly and to use a fine, sharp needle. The needles should be the finest obtainable, No. 28. Either the artery or the vein may be punctured, the more complete capillary injections always being made through the artery. For embryos from 7 to 15 mm. long it is not necessary to tie off any of the vessels of the membranes; above this stage it is practically impossible to obtain complete injections without previously tying off the group of vessels of the membranes which are not used for the injection. The vein which accompanies the artery injected gives a sufficient vent for the fluid. The specimen should be kept moist with amniotic fluid. If extravasations occur in the skin vessels, they are readily seen at the time of injection and in general they are sure to occur if the embryo is not perfectly fresh; that is, perfect injections are never obtained unless the embryo is still warm, the heart beating, and there are no previous extravasations of blood due to rough handling. If any ink escapes on the surface of the skin, it must be washed off in running water before fixation, if the specimen is to be cleared *in toto*.

In the study of complete injections made with India ink, all of the vessels can be analyzed in the early stages; but as soon as the vascular system becomes complex, as in embryos of about 15 mm. in length, it becomes practically impossible to distinguish all the arteries from the veins. This can readily be seen, for example, in an injection such as the one shown in figure 10, plate 4. In these stages one can not determine with certainty given vessels without obtaining injections that will bring out just these arteries, or these arteries with their arterial capillaries or again just these veins. This precision of injection can be obtained by the use of silver nitrate as the injecting fluid. For embryos I use a solution of 0.25 per cent of silver nitrate in distilled water. The silver solution does not run readily. By varying the amount of fluid injected and the point of injection one can obtain either a partial injection of the entire embryo or a partial injection of any organ. The silver solution kills the endothelium and immediately whitens it, so that it is possible to estimate approximately the extent of the injection and to stop it at any desired point. The flow of the silver solution stops as soon as the pressure is taken off, that is to say, the flow of the solution is due entirely to artificial pressure and is not aided at all by the heart-beat nor by the constriction of the blood-vessels. For general arterial injections it is best to inject with a hypodermic syringe into the umbilical artery. For an embryo 20 mm. in length I use about 1 c.c. of the fluid. To fill the arterial capillaries it is only necessary to use more of the solution. For venous injections, since an injection of silver into the umbilical vein usually fills only the veins of the liver, I use a glass canula and inject directly into the primary head vein. If the embryo is placed in a strong light under the binocular microscope, the vein can practically always be made out, especially just behind the ear, by the presence of a little blood in it. An example of such an injection is shown in figure 5, plate 2. As soon as the injection is complete, the embryo should be placed in a bowl of distilled water and exposed to direct sunlight or to the table arc light to reduce the silver nitrate.

In the study of the vascular system, the Spalteholz method for clearing entire specimens, described in his article published in 1914, is invaluable. In general the essentials of the method are, first, fixation in formalin; second, a thorough bleaching of the tissues with

hydrogen peroxide to remove the hemaglobin and other pigments; third, dehydration; and fourth, clearing the specimens in an oil which has the same index of refraction as the tissues. As applied to embryonic tissues, the method, developed under the direction of Professor Spalteholz, to whom I am very much indebted, is as follows: The specimens which have been injected with India ink are fixed for 24 to 48 hours in 5 and 10 per cent formalin. Commercial formalin is slightly acid, which is an advantage for the India-ink injections, since the ink diffuses in an alkaline solution. Specimens which have been injected with silver nitrate are ruined by fixation in formalin, because the silver salt is changed to a white precipitate which obscures the vessels. If injections of bone are desired, the formalin may be made slightly alkaline and the diffusion of the ink prevented as much as possible by tying off all the vessels before fixation. For large fetuses, which are to be cleared *in toto*, Dr. P. G. Shipley has found that the subsequent bleaching is made easier by washing the specimen in running water before fixation, thus removing much of the hemaglobin. After fixation, the specimens are washed in running tap-water from 12 to 24 hours, followed by distilled water to remove the formalin. The bleaching is done in hydrogen peroxide. Spalteholz adds a few drops of ammonia to precipitate the barium salts. This is not necessary with barium-free peroxide. For adult tissue, Spalteholz uses undiluted peroxide; for the embryonic tissues about 2 to 3 per cent is the best strength. The small embryos with ink injections take about 20 minutes to bleach; for the silver specimens, 2 to 3 minutes suffice and they must be watched constantly and the bleaching stopped before the silver is affected. Following the bleaching, the specimen must be washed thoroughly in running water and in distilled water. The dehydration may be begun with 50 per cent alcohol and the percentage increased successively by five points or less. After two changes of a good grade of absolute alcohol, the specimens are passed through two changes of benzene into the synthetic oil of wintergreen. The small amount of benzene which is carried over evaporates quickly, and the few bubbles which develop in the bleaching process can be removed with needles. The oil of wintergreen should be entirely colorless, but both the specimens and the oil will gradually become brown with age. This is especially true of the silver-nitrate specimens, but they will keep for six months or a year in oil. They can be returned to alcohol for storage and recleared when desired, or they may be made permanent in balsam. The advantage of keeping the total specimens in oil rather than in balsam is that they can be dissected. On the other hand, they are much more permanent in the balsam. The oil of wintergreen makes the tissues tough, so that it is possible to obtain minute dissections of the injected specimens.

The Spalteholz method as applied to embryos can be very much simplified by changing the fixative. For mammalian embryos the best fixative is Carnoy's mixture. This is absolute alcohol 60 parts, chloroform 30 parts, and glacial acetic acid 10 parts. In this mixture the acid is sufficiently strong to bleach the hemaglobin so that the peroxide is unnecessary. The penetrating power of the fixative is very great, which is of importance, since no injected specimen can be cut into until it is thoroughly fixed. The relations of the tissues are well maintained and the swelling due to the acetic acid tends to counteract the shrinkage that always takes place in the oil of wintergreen. The fixative does not affect any of the injection fluids. The process after fixation in the Carnoy's mixture is simple; the specimens remain in the fixative from 2 to 12 hours and are then placed directly into 70 per cent alcohol, dehydrated in graded alcohols, and cleared as before. The specimens can then be studied *in toto*, or dissected or embedded in paraffin and sectioned. They should be embedded through a mixture of the oil of wintergreen and paraffin. They do not become brittle in the oil, so that they may be sectioned after staying in the oil for many weeks. The shrinkage in the oil, however, seems to increase on long standing.

The advantages of the fixation in Carnoy's mixture are that the specimens are even clearer than after bleaching with peroxide, there are no bubbles formed to damage the tissues, the time of the procedure is shortened, and the fixation is much better should it be desired to section the specimens after studying the vessels in whole embryos. Specimens which are strongly pigmented, however, must be bleached with hydrogen peroxide before they can be cleared.

GENERAL ANALYSIS OF THE PRIMITIVE VENOUS SYSTEM.

It has been the universal opinion that the primary veins of the embryo, as distinct from the veins of the embryonic membranes, are two, namely, the anterior and the posterior cardinal. In recent years the idea has developed that the umbilical vein is in part a vein of the membranes and in part a true vein of the body-wall, so that in this double relation it differs from the omphalo-mesenteric veins. It was shown by Miss Helen Smith, in 1909, that in the embryo pig, up to 10 mm. in length, all of the veins of the body-wall ventral to the myotomes drain into the umbilical veins. Moreover, these veins in the body-wall are non-segmental and have no accompanying arteries. In 1909 and 1912 H. M. Evans demonstrated that the primitive limb-bud veins drain not only into the posterior cardinal vein, but into the umbilical vein as well, and thus it is fully established that the umbilical vein is in part one of the primitive veins of the body-wall.

It has been shown that in the chick the first vein of the embryo is the duct of Cuvier, which develops as a direct cross-connection between the aorta and the vitelline veins and that the anterior cardinal, the posterior cardinal, and the umbilical veins develop as a further extension of the vascular arch between the aorta and the venous end of the heart. (Evans, 1909; Sabin, 1915.) Moreover, in the pig a mesial cardinal vein, the so-called subcardinal vein of F. T. Lewis, develops from the lateral branches of the aorta at the same time and in the same manner as the posterior cardinal vein. On account of its relation to the Wolffian body and to the posterior cardinal vein, the name mesial cardinal vein seems to me better than subcardinal. It is therefore necessary to recast the general statement in regard to the primitive veins of the mammalian embryo. The primary venous arch of the embryo is the duct of Cuvier, which connects the aorta with the vitelline veins and makes the first circle for blood within the embryo. Then, in succession, four veins form which may be grouped as the primary venous system of the embryo. First, an anterior cardinal vein by which the capillaries to the brain connect with the duct of Cuvier and establish a circulation for the head; second and third, a posterior and mesial cardinal vein from lateral branches of the aorta to the duct of Cuvier, developing in relation to the Wolffian bodies; fourth, the umbilical veins as an arch between the aorta and umbilical arteries, and the duct of Cuvier. It is clear that the anterior, posterior, and mesial cardinal veins make one system and may be considered as a primary venous trunk connecting with the heart through the duct of Cuvier and definitely accompanying the aorta, while the umbilical vein is in part a vein of the membranes and in part a vein of the body-wall, and is more remotely an accompanying vein to the aorta; that is to say, it forms an arch which is more like the wide arch of the early circulation of the embryonic membranes.

The study of the development of the main veins of the body of the embryo consists, then, in tracing how four veins—the umbilical, the anterior, posterior, and mesial cardinal veins—develop, or disappear, or are transformed.

Since the work of Goette in 1875, quoted from Hochstetter (1893), it has been known that the development of the vena cava in the liver was determined by a secondary connection of the cardinal system with the sinusoids of the liver. In 1901-02 this process was

clearly explained by F. T. Lewis, who showed that the connection of the general cardinal system with the liver was not made by the posterior cardinal veins, but by the subcardinal or mesial cardinal vein of the Wolffian body. He showed that this connecting vein joined the liver through the caval right mesentery. Since the sinusoids of the liver, with which the mesial cardinal vein connects, drain directly into the large remnant of the omphalo-mesenteric vein, the vena hepatica communis of Hoehstetter, the vena cava within the liver is made from two elements, namely, the omphalo-mesenteric veins and certain hepatic sinusoids. Below the liver the vena cava is formed primarily from the mesial cardinal veins with their great anastomosis across the midline.

I can now show that the posterior cardinal vein disappears with the Wolffian body. It does not persist either as a part of the azygos system or as a part of the vena cava, but certain new veins (namely, the thoraco-epigastric and other veins of the body-wall, together with the azygos system, the ascending lumbar veins, and the lower segment of the inferior vena cava) develop to take over the drainage of the spinal cord and the body-wall. The azygos veins are not transformed posterior cardinal veins, but are new prevertebral veins which have their main and permanent connection with the heart through the duct of Cuvier. They grow large because, as the posterior cardinal veins are disappearing, they take over the spinal and intercostal veins. Moreover, the inferior vena cava itself, while it may be considered as a substitute for the cardinal system of veins, is not even in part a transformed posterior cardinal vein. Of the entire cardinal system in the mammal, the anterior cardinal veins persist as the internal jugular veins, the duct of Cuvier persists either on one or both sides according to the form, but the posterior cardinal veins disappear.

THE VEINS OF THE WOLFFIAN BODY.

GENERAL SURVEY OF THE VEINS.

The study of the posterior cardinal veins in this paper will begin with an early stage of the embryo before the tail begins to curve (fig. 1, pl. 1). In the head, only the mid-brain bend has taken place. It is a stage measuring from 8 to 9 mm., but is considerably younger than embryos measuring the same after the tail has curved. This stage is about Keibel's figure 12 in the *Normaltafeln, Das Schwein*; it is before the posterior limb-bud appears. As seen in the figure, the heart has a definite ventricle and atrium, the brain has three vesicles, and there are three gill clefts. A study of still earlier stages shows that both the posterior and the mesial cardinal veins in the pig develop from lateral branches of the aorta and that the two veins are longitudinal anastomoses between these lateral branches, which in turn correspond to the developing tubules of the Wolffian bodies. The two longitudinal vessels are connected by branches determined by the pattern of the nephritic tubules. The posterior and mesial cardinal veins unite in a common stem which joins the duct of Cuvier. (Sabin, 1915.)

It has long been known that the posterior cardinal veins become incorporated early into the Wolffian bodies, and I wish here to emphasize the fact that the mesial cardinal vein (subcardinal) is primarily a vein of the Wolffian body, so that the study of the cardinal system for the posterior part of the embryo is a study of the circulation of the Wolffian body.

This subject has been extensively studied, notably by Rathke in 1830, and more recently by Hoehstetter, Minot, J. B. MacCallum, F. T. Lewis, Zumstein, and Davis. A study of the veins of the Wolffian body of the pig must be especially based on the work of Minot in 1899, in which the main points are brought out. Injections show that the posterior cardinal vein forms along the edge of the Wolffian body, extends the full length of the dorsal border of the organ, and is continued into the caudal vein at the lower pole.

As has just been stated, there are at first but two veins in the Wolffian body, a posterior and a mesial cardinal, and these form a common stem, the direct continuation of the posterior cardinal which connects with the duct of Cuvier. This condition is found in embryo pigs measuring 6 to 7 mm., when the mid-brain curve is the only curve of the cephalic end of the embryo, and the tail is not curved at all. The next stage in the development of the veins, as seen in figure 1, is characterized by three longitudinal veins, showing still the most important primitive relation of the veins, namely, that the mesial cardinal vein drains into the posterior cardinal. Figure 1 is from an injection with silver nitrate made into the anterior cardinal vein of a pig embryo 9 mm. long. It is clear that, even at this early stage, the mesial cardinal vein, though not as long as the posterior cardinal vein, is distinctly wider. The posterior cardinal vein runs the full length of the Wolffian body and is continued into the caudal vein. The Wolffian body is represented as transparent and the mesial vein is seen through it, lying along the ventro-mesial border of the organ. The mesial cardinal vein is connected by many large superficial mesial vessels with the posterior cardinal. These can be seen as distinct vessels only in the posterior part of figure 1, for in the anterior part they are obscured by the extensive capillary injection within the Wolffian body itself. The mesial cardinal vein curves dorsalward to join the posterior cardinal vein at a point somewhat caudal to the cephalic pole of the Wolffian body.

The third longitudinal vein, the ventral or ventro-lateral, begins at the anterior pole of the organ, where it joins the posterior cardinal vein. At the stage of figure 1 it is the smallest of the three long veins. In its course it follows the path of the Wolffian duct lying just mesial to it. It is represented in the figure as if cut off, but in the specimen it breaks up into capillaries a short distance below the point at which it is shown cut off. It is clear that this ventro-lateral vein is connected by transverse veins with both the posterior and the mesial cardinal veins.

As the tail of the embryo begins to curve and the limb buds develop, certain very important changes take place in the veins of the Wolffian body. These are shown in figure 2, plate 1, from an injection of silver nitrate into the veins of an embryo measuring 8 mm. in its longest diameter, and in figure 3, from a similar injection in an embryo measuring 11 mm. The further development of the ventral vein, to the caudal pole of the organ, where it also connects with the mesial cardinal veins, establishes the three longitudinal veins of the Wolffian body. In general these three main veins lie just beneath the capsule, and the posterior cardinal vein has as its primary position the dorso-median angle of the Wolffian body along the edge of the body-cavity, while the mesial vein lies medial to the nephritic arteries and the lateral vein lies just mesial to the Wolffian duct.

The position of these three veins can be recognized in section in figure 6, plate 3, which is from an embryo pig 9.5 mm. long, about the stage of figure 2. In general, such a survey of the vessels of an organ as is given in figure 2 is exceedingly valuable in studying the vascular system by means of serial sections—in fact, by an easy method and without the chances of error, it gives the results of reconstruction. For example, if imaginary sections are taken through figure 2, it is clear that a longitudinal vein in one section must appear as a part of a transverse vein at the next level.

The section of figure 6 is through the lower half of the Wolffian body just below the level of the ventral vein as seen in figure 2. It shows the posterior cardinal vein in its primitive position in the dorso-median angle of the Wolffian body and at the edge of the body-cavity. The mesial vein is in the characteristic position mesial to a nephritic artery. The section shows two large transverse veins, one connecting the mesial and posterior cardinal veins and the other along the ventral surface of the organ. The position of the ventral

vein is indicated in the legend, but it is only in a little older stage that it extends so far caudalward (fig. 3). By the time the embryo is 11 mm. long the ventral vein extends the full length of the organ and joins the mesial vein. It must, however, be pointed out that it is only for a short time that the conditions of three complete longitudinal veins (extending throughout the organ as shown in figure 3) remain. By the time the embryo is 12 or 13 mm. long the marked development of the mesial cardinal system as a part of the vena cava has caused a breaking of the longitudinal veins, which remain as the main veins only for the anterior third of the organ.

THE POSTERIOR CARDINAL VEIN.

Each of these three veins must now be considered in detail. The dorsal vein, which is the original posterior cardinal vein, lies at first along the dorso-median border of the Wolffian body and receives all the spinal veins. In view of its later history, however, it is noteworthy that there are variations from this primary position in embryos as early as the 8 mm. stage. For example, in figure 2 the dorsal vein is deflected to the lateral surface for a short distance in the lower half of the organ and then returns to the dorso-medial border. In fact, though the dorsal vein is complete in this specimen, its caudal part was injected through the medial vein. Opposite the area in which the dorsal vein does not lie in the dorso-median angle the spinal veins drain into certain transverse veins. Another more common variation than that shown in figure 2 is that the main dorsal trunk is deflected to the lateral surface for the lower quarter of the organ. These variations explain why it is not always possible to find the dorsal vein exactly in the dorso-median angle of the Wolffian body throughout, even in stages as early as those measuring 8 to 10 mm. In fact, there is a marked tendency for the dorsal vein to be deflected from the dorso-median angle, so that in some specimens measuring 10 mm. the dorsal vein is so much deflected that it receives only the most anterior of the spinal veins of the area corresponding to the Wolffian body. This deflection of the posterior cardinal vein around to the lateral surface of the cephalic part of the organ is found in practically all specimens of embryo pigs about 12 to 13 mm. long. Its final position obliquely across the dorso-lateral surface of the organ is shown in figure 4, plate 1, from an embryo 23 mm. long. The process by which the posterior cardinal vein becomes limited to the cephalic end of the Wolffian body, as seen in figures 4 and 5, is involved in a study of the mesial cardinal vein.

THE MESIAL CARDINAL VEIN.

The mesial cardinal vein is by far the most important of the veins of the Wolffian body. By the time the embryo is 18 mm. long, it is already the largest vein of the organ. Referring to figure 2, the fluid injected into the anterior cardinal vein ran in three directions into the liver, into the posterior, and into the ventral cardinal vein, while the most extensive injection of the Wolffian body was through the medial cardinal vein by means of its anastomosis with the posterior cardinal vein. The mesial cardinal vein lies obliquely across the mesial surface of the Wolffian body, joining the posterior cardinal about one-third the length of the Wolffian body from its anterior pole. At this stage the most important point in the development of the mesial cardinal vein has been established, namely, that it has formed the connection through the right caval mesentery with the posterior lobe of the liver. The position of this connection is shown in dotted lines in figure 2, the lines being drawn from an injection of another specimen from the same litter of pigs. The development of this connection between the right mesial cardinal vein and the liver is well known through the work of Minot, F. T. Lewis, and Davis. The present work serves to emphasize more strongly the position of Minot, that the vena cava develops primarily to drain the

Wolffian body. The mesial cardinal vein becomes the chief vein of the Wolffian body and thus the vena cava forms to drain that organ. It is true that, even as early as the stage represented in figure 1, the mesial cardinal vein has tiny tributaries in the mesentery and subsequently the territory of direct drainage into the vena cava is increased through taking over the common trunk of the caudal vein and the primitive fibular vein, but primarily it drains practically only the Wolffian body.

The two mesial cardinal veins anastomose freely across the mid-line ventral to the aorta. At the stage of figure 2, in embryos 8 mm. long, there are two large anastomoses, the anterior one being just caudal to the junction of the mesial and posterior cardinal veins. Subsequently there may be five or six anastomoses, which finally fuse to make the median mesonephritic vein of Minot. This abundant anastomosis accompanies the unilateral development of the vena cava in the right caval mesentery.

THE ANTERIOR MESIAL VEIN OF THE WOLFFIAN BODY.

Just at the anterior pole of the Wolffian body there is a short mesial vein lying between the dorsal and the ventral veins (fig. 2). This short vein does not connect with the main mesial or subcardinal vein, but rather with the posterior cardinal vein. It drains the mesial surface of the anterior pole of the organ and is present and constant on both sides. The vein is important because it is constant and remains for a considerable time (fig. 4, plate 1, and fig. 10, plate 4) and hence must be distinguished from the developing azygos vein, which will be brought out later. Its fundamental difference from the mesial cardinal vein is that it retains its connection with the posterior cardinal system and never joins the vena cava, whereas a comparison of figures 2 and 3 shows that the circulation through the mesial cardinal vein is gradually thrown entirely through the liver.

THE VENTRAL VEIN OF THE WOLFFIAN BODY.

The third longitudinal vein of the Wolffian body, the ventral vein, eventually extends the full length of the organ (fig. 3) and joins the two other veins at the caudal pole, while it joins the posterior cardinal vein at the anterior pole of the organ. In fact, the posterior cardinal vein might be said to bifurcate at the anterior pole of the organ into a dorsal and a ventral branch. This is well known and was figured by Minot. The ventral vein extends along a ridge on the ventral surface of the Wolffian body, in which lies the Wolffian duct. In a general way this ridge marks a boundary between a mesial glomerular zone and a lateral tubular zone, as seen from the ventral aspect (fig. 4); the vein lies just mesial to the Wolffian duct (fig. 6). In early stages the ridge extends along the ventral border of the organ, but as the tubules become convoluted and so take up more space it becomes a curved line on the ventral surface (fig. 4).

THE TRANSVERSE VEINS OF THE WOLFFIAN BODY AND THE VENA CAVA.

Having described the longitudinal veins of the Wolffian body, it is now necessary to take up the transverse superficial veins, which are both characteristic and important. These veins have not yet been adequately emphasized, so far as I am aware. The longitudinal veins are connected by two sets of transverse veins, the lateral and the mesial. Both are present from the very beginning of the formation of the posterior and mesial cardinal veins from the lateral branches of the aorta and have from the first a characteristic pattern. The lateral transverse veins connecting the dorsal and ventral veins are small, regular, and in the beginning alternate with the straight transverse tubules of the organ, so that there are as many transverse veins as there are tubules. An injection of the tubules with silver nitrate gives the negative pattern to that of the transverse veins shown in figure 3. These

transverse veins receive many vessels from the depth of the organ (fig. 6) and have tiny anastomoses with each other.

The transverse veins of the mesial surface (fig. 2) connect the mesial vein with the other two. They are always larger than the lateral and are few in number. The importance of the transverse veins is that they develop into the largest tributaries of the vena cava as long as the Wolffian bodies persist. This transition will be readily followed by comparing figures 2, 3, 4, and 5, from embryos 8, 11, 22, and 23 mm. long. By means of the marked development of the transverse veins the circulation of the caudal two-thirds of the organ is shifted over to the mesial vein (fig. 5, plate 2). Indeed, the entire relation of the vena cava is foreshadowed in figure 2, from an embryo pig 8 mm. long, in the large anastomosis of the mesial and posterior cardinal veins about the middle of the organ. Within the Wolffian body the lateral veins opposite the median mesonephritic vein become the chief roots of the vena cava, so that from the dorsal view the vena cava appears to bifurcate into these great transverse veins (fig. 14, plate 6). The median mesonephritic vein corresponds in the adult to the vena cava opposite the renal veins. Thus the posterior cardinal vein becomes more and more limited to the anterior pole of the organ (fig. 4), while in the caudal pole only remnants remain connecting the transverse veins (figs. 5 and 14). This change (by which the posterior and ventral veins become limited to the anterior pole of the organ) takes place while the embryo is developing from 12 to 13 mm. in length. The posterior cardinal vein, then, does not become a permanent part of the vena cava, but disappears as the Wolffian body disappears. This point will not be wholly proved until the subject of the relation of the primitive fibular and caudal veins is taken up in detail. In general, in the stage represented by figure 3, the caudal vein is a continuation of the posterior cardinal vein and the blood from the tail and from the hind limb bud passes through the Wolffian body to the heart, either by way of the posterior cardinal vein or by way of the vena cava. At the stage of 12 to 13 mm. the changes of the circulation within the Wolffian body bring about the condition that almost all of the blood from the tail and hind limb bud passes through the veins of the Wolffian body, chiefly through remnants of the posterior cardinal veins in the caudal half of the organ, to the vena cava; while at the stage of 22 mm. (shown in fig. 5) most of the blood from the tail and hind limb bud passes around the Wolffian body to the vena cava and only a small part of it takes the earlier route through the veins of the Wolffian body. The process by which this shifting of the circulation around the Wolffian body takes place is bound up with the study of the prevertebral plexus of veins, which is taken up later, first in connection with the azygos veins and secondly in connection with the vena cava.

The importance of figure 5 is that it represents all of the permanent fundamental relations of the adult vena cava. The inferior vena cava thus consists primarily of a part within the liver derived from the omphalo-mesenteric vein and certain hepatic sinusoids, and of a part within the Wolffian body derived from the mesial cardinal veins and their tributaries, the transverse veins connected by remnants of the posterior cardinal veins. At first the vena cava drains the tail and hind legs only through the Wolffian body. Subsequently the blood from the caudal end of the embryo is shifted around the Wolffian body and that organ disappears. From this history the vena cava, inasmuch as it arises mainly from the omphalo-mesenteric and mesial cardinal veins, is to be regarded as one of the earliest veins of the embryo rather than as a late development. The final vena cava is made from three main sources: above and within the liver mainly from the omphalo-mesenteric veins; in the interrenal segment from the mesial cardinal veins; and below the kidneys from the prevertebral plexus. In other words, its ventral segment comes from the

omphalo-mesenteric and mesial cardinal veins, while its dorsal part comes from the prevertebral plexus.

The relations of the mesial cardinal vein of the left side and of the vena cava on the right side to the veins of the esophagus is an interesting one. In studying sections of injected embryos measuring 7.5 to 9.5 mm. long, it is clear that on the right side the vena cava (as seen in figure 2) passes forward a short distance in the caval mesentery and then curves ventralward toward the liver. Just at the point where it curves ventralward a branch continues forward in the mesentery in the same dorsal position beyond the anterior end of the Wolffian bodies and finally anastomoses with the esophageal vessels just below the bifurcation of the trachea. On the left side a corresponding branch, which is much shorter, extends a short distance in the mesentery from the level of the anastomosis of the two mesial cardinal veins, and also anastomoses with the esophageal veins.

THE GENERAL CIRCULATION OF THE WOLFFIAN BODIES.

At this point it may be well to take up the entire circulation of the Wolffian bodies in the stages represented by figures 1 to 5, namely, in pigs measuring 7 to 23 mm. in length. In his article on the veins of the Wolffian bodies, Minot (p. 268) says: "The character of the circulation within the Wolffian bodies is not quite clear, for although the circulation of the blood channels between the tubules with the veins is easily determined, the pathways of the arterial flow are obscure." This point is entirely cleared up by the silver-nitrate injections. The mesonephritic arteries entering the glomeruli are well known. There are 16 pairs of ventro-lateral branches from the aorta, not entirely symmetrical, which enter groups of glomeruli arranged in series along the hilum of the organ. The silver specimens make plain that each glomerulus has two or three efferent arteries emerging from the side or opposite pole of the glomerulus, as can be seen in section in figure 6. These efferent arteries were shown by John B. MacCallum in 1901-02. The vessels are at first capillaries, but by the time the embryo is 20 to 25 mm. long they are distinct arterioles, with a wall thicker than the walls of the veins of the organ. The silvered specimens show that these efferent arteries leave the glomerulus near the point of origin of the Wolffian tubules, so that the afferent artery enters the mesial pole of each glomerulus, while its efferent artery and its tubule leave the lateral surface. The efferent arteries enter the characteristic plexus around the tubules which in later stages become a complete cast of vessels, as it were, around the tubules. In embryos 9 mm. long (as is shown in figure 6) the efferent arteries are short, while at 15 mm. they may extend half way across the Wolffian body before breaking up into capillaries. All of the efferent arteries run transversely to the long axis of the organ. The silvered specimens show that the capillaries or sinusoids of the Wolffian body are definite vessels with a complete wall of endothelium, making an excessively complex plexus around the tubules.

The circulation of the blood of the Wolffian bodies is as follows: The blood enters the glomeruli through the afferent arteries at their mesial pole; it leaves the glomeruli through two or three efferent arteries from the lateral surface. These arteries open into a capillary plexus which surrounds the tubules and collects into veins which run transversely to the long axis of the organ. These capillary plexuses (as seen in figure 6) all run transversely, following the pattern of the tubules as they become convoluted, and drain into the transverse and longitudinal surface veins. As is indicated in figure 2, the transverse veins connecting the dorsal and mesial veins are larger than the lateral transverse veins in stages from 8 mm. on, so that there is an early tendency for the capillaries to drain toward the mesial cardinal system and thence into the vena cava.

From the stage of about 13 mm. onward, the blood of the anterior third of the organ is collected by three short trunks (a posterior cardinal vein, a ventral vein, and a short anterior mesial vein) and drained into the duct of Cuvier. All of the rest of the blood of the organ passes through transverse veins into the vena cava. The anastomosis of these two areas through the capillary bed is very complete. This stage of the circulation is shown in figures 4 and 5. The complete disappearance of the posterior cardinal veins, as the Wolffian bodies disappear, will be followed in connection with the development of the azygos system. The short trunk of the posterior cardinal vein in the cephalic part of the Wolffian body eventually lies obliquely across the dorsal surface of the organ and is only in its primitive position, just at the anterior pole (fig. 4). Its length is subject to great variation, even on the two sides of the same embryo (as seen in fig. 4). The ventro-lateral vein and the short mesial trunk are likewise limited to the anterior pole of the organ. The system of the vena cava is represented in this figure only by the transverse vein of the left Wolffian body. The relative position of the Wolffian body (in the two stages of 10 and 20 mm.) with reference to the duct of Cuvier is to be seen at a glance by comparing figures 3 and 4. The Wolffian body is gradually dragged caudalward, and hence the part of the posterior cardinal vein anterior to the organ itself is gradually lengthened. Subsequently the anterior pole of the Wolffian body is pushed far to the side by the developing kidney.

From the preceding description it will be seen that the circulation of the Wolffian body belongs to the primitive type—that is, it is a circulation in which the veins never accompany the artery, but rather run as far as possible from it. The arteries are in the center of the organ and the veins on the periphery. In the early stages three longitudinal veins make up the cardinal system, draining into the duct of Cuvier. These three veins are very abundantly connected by transverse veins. As soon as the vena cava is established by the connection of the right mesial cardinal with the liver, a marked development of the transverse system takes place by which the circulation of about two-thirds of the organ is shifted from the duct of Cuvier to the vena cava. In this process the posterior cardinal vein eventually disappears.

AZYGOS AND HEMIAZYGOS VEINS.

GENERAL SURVEY.

The azygos and hemiazygos veins are new longitudinal veins which develop in relation to these changes in the circulation of the Wolffian bodies and in connection with changes in the circulation of the body-walls. They are not transformed posterior cardinal veins. The facts following have been emphasized already: that the posterior cardinal vein drains primitively the spinal veins and the caudal veins; that there are two primitive veins of the Wolffian bodies, the posterior and the mesial cardinal; and that the posterior cardinal system breaks up within the Wolffian body into a number of veins after the mesial cardinal establishes its connection with the liver. The vena cava, which then drains most of the Wolffian bodies and thus subsequently the renal veins and the iliaes, may be considered the substitute for the cardinal system of the Wolffian bodies. The anterior portion of the posterior cardinal system draining the anterior pole of the Wolffian bodies disappears entirely with the Wolffian bodies, and the corresponding spinal veins drain into the new azygos system. The remnants of the posterior cardinal system in the caudal pole of the organ likewise disappear, and the corresponding spinal veins drain into the vena cava and ascending lumbar veins. Confusion has arisen from the conception that the azygos veins and a part of the inferior vena cava were transformed posterior cardinal veins.

The prevailing view in regard to the origin of the azygos veins has developed through the early work of Rathke and especially through that of Hochstetter. Rathke's first idea

of the azygos system (1830, p. 67) seems to have been based on theoretical grounds; he said that in sheep the hemiazygos vein replaced the left inferior vena cava and that in the sheep and the pig the azygos vein did not develop. Subsequently (1838) he stated the theory that the azygos and hemiazygos veins were transformed posterior cardinal veins down to the sixth dorsal vertebra, and that below this point they were from longitudinal anastomoses between the intercostals. The work of Hochstetter forms the basis of the modern work on the venous system. His work on the azygos veins was done especially on guinea-pigs and his conclusions are that down to the tenth dorsal segment (1893, p. 574), or, stated in general terms for mammals (1906, p. 145), through the thoracic cavity, the azygos and hemiazygos are transformed posterior cardinal veins, while below that level they are new veins. This new vein he described as formed in the following manner (1894, p. 488): the segmental veins give up their connection with the posterior cardinal vein and become collected into a longitudinal trunk which lies dorsal to the aorta. That is to say, the lower part of the azygos is a longitudinal anastomosis between the roots of the spinal veins. In this connection he noted that the segmental veins were originally ventral to the sympathetic system and subsequently became dorsal. This point will be thoroughly explained in the following pages, as well as the true relation of the spinal veins to the azygos system.

Zumstein was the first to give an entirely correct statement of the origin of the azygos veins (1897, p. 175). In studying the veins of an embryo guinea-pig of about 23 days, he says that near the cephalic end of the posterior cardinal veins two new veins appear, dorsal to the cardinal near the bodies of the vertebræ. They join with the cardinal near the duct of Cuvier and become the azygos and hemiazygos veins. In embryos a little larger he noted that both the cardinals and the more dorsal azygos veins were present, and that subsequently the cardinals became rudimentary. In his figure 9 he shows both the posterior cardinals and the azygos veins in the same specimen.

In the previous year Zumstein had published a study of the relations of the vena cava to the azygos and hemiazygos veins in human embryos and in the adult, in which he took the view that the azygos and hemiazygos veins were transformed posterior cardinal veins.

The following year Parker and Tozier made the next step in advance. In studying the development of the posterior cardinal veins in the pig, they noted that the cardinal veins, after becoming incorporated in the Wolffian bodies, become interrupted within the Wolffian bodies at the stage of 12 to 13 mm., and that the anterior portion of each posterior cardinal vein received blood not only from the Wolffian bodies but from the tissue between. This they found was due to a new outgrowth of vessels from the posterior cardinal veins near the anterior end of the mesonephros. These new accessory veins were the azygos and hemiazygos veins, which they described as having extremely delicate walls (capillaries) without a complete lumen, and as gradually progressing caudalward. The point of not having a complete lumen is, I think, due to a collapsing of the walls of the capillaries, since injections of a complete capillary network are readily made at the same stage. But the discovery of Parker and Tozier that the azygos and hemiazygos are new veins from a new subvertebral capillary plexus is the correct view, and is the main point. They found that these new vessels start from the posterior cardinal veins near the cephalic end of the mesonephros, but the permanent place of union of these new vessels with the cardinal system they thought to be at the level of the tenth rib, so that they finally agreed with Hochstetter that the thoracic part of the vessels came from the posterior cardinal veins and the rest from a new subvertebral plexus. This work of Parker and Tozier corrects the view of Rathke that the azygos veins are longitudinal anastomoses of the intercostals, and the view of

Hochstetter that they are longitudinal anastomoses of the spinal veins, but it is incorrect in regard to the relations of the new azygos veins to the posterior cardinals, for the permanent connections are not opposite the tenth rib, but at the duct of Cuvier on both sides. If both ducts of Cuvier are permanent, both right and left azygos veins open into the heart through them in the adult, as is the case in the pig. If, as in the human, the left duct of Cuvier disappears, the left azygos vein drains into the heart by means of anastomoses with the corresponding vein of the other side.

Since the work of Zumstein and of Parker and Tozier emphasizing the new prevertebral vessels as forerunners of the azygos veins, there have been two different views in regard to the relation of these new veins to the posterior cardinal veins. McClure stated in 1906 that in the marsupials the azygos vein was formed from the new vein plus the proximal end of the posterior cardinal vein. In 1912 Kampmeier expressed the view that, in the cat, the portion of the azygos vein between the duct of Cuvier and the Wolffian body was made by a longitudinal fusing of the new vein with the posterior cardinal vein. The present study demonstrates that in the pig the posterior vein disappears entirely and does not enter into the formation of the azygos vein.

CIRCULATION OF A TYPICAL BODY-WALL SEGMENT WITH RELATION TO THE AZYGOS VEINS.

In order to follow the origin of the azygos veins it is necessary to consider the general vascular pattern of the body-wall in the stages that precede them. The azygos veins begin in the embryo pig in stages measuring from 13 to 14 mm. If we consider the development of a typical body-segment up to this stage, it will be remembered that Evans, in his chapter in the *Manual of Human Embryology*, Keibel-Mall, 1912, brings out the fact that the primitive circulation of a body-wall segment consists of a medial spinal artery, a capillary plexus in the pia, and a lateral spinal vein. In the development of the vascular system of the body-wall in the mammal there are two sets of arteries, a dorsal and a lateral. The dorsal arteries, which are intersegmental, pass to the cord, and establish a longitudinal anastomosis along its lateral surface. The lateral arteries are not segmental, but also establish a longitudinal anastomosis in the Wolffian groove. This longitudinal vessel becomes connected with the posterior end of the heart and makes the primary venous system. The lateral arteries, except those going to the glomeruli of the Wolffian bodies, then disappear. When the dorsal segmental arteries connect by segmental branches with the cardinal vein the embryonic venous arch of a typical body-wall segment is established and this is the embryonic arch of Evans, dorsal segmental artery, capillary plexus of the pia, spinal vein to the cardinal vein. This arch can not be said to be primary in the sense of origin, since the dorsal segmental vessels do not give rise to the cardinal vein in the mammal. In other words, the first veins in the body-wall of the mammalian embryo are longitudinal chains from the lateral arteries and it is only when the dorsal or segmental arteries connect with this vein that there is a segmental vascular arch. The capillary circulation of the cord consists, as Evans has shown, of a primary capillary plexus along the dorso-lateral surface of the cord, and of a secondary ventral plexus along the surface of the cord in which the spinal arteries pass to the anterior spinal artery. The primitive dorsal segmental arteries fork into a ventral and a lateral branch just between each ganglion and the cord. Besides the two branches of the spinal artery, ventral and lateral, each ganglion receives one or more tiny arteries (fig. 6).

From the standpoint of the development of the azygos veins, the part of the vascular arch of a body-segment that is of most interest is the spinal vein. Moreover, the important point is the position of these veins. As can be seen in figure 6, the spinal veins lie wholly

in the sagittal plane passing lateral to the spinal ganglia. The spinal veins collect the blood from an exceedingly abundant capillary plexus around each ganglion, and the vein in each case corresponds to the cephalic surface of the ganglion. This point is clear in figure 4, from a pig 7 mm. long, in my articles of 1913. Thus, from the edge of each spinal ganglion a short, stout vein passes ventralward to the posterior cardinal vein (fig. 6) in a plane corresponding to the edge of the body-cavity and distinctly farther lateralward than the position of the future azygos system.

While the primitive spinal arch is being elaborated, the next step is being made—namely, the second vascular arch of a typical body-segment is being formed. As can be seen in figure 6, a tuft of arteries from the root of the dorsal segmentals or the adjacent part of the aorta itself grows to a third longitudinal capillary plexus, which extends throughout the body and lies lateral to the myotomes. This capillary plexus, which is shown for the neck region in figures 4 and 5 of my articles of 1913, is very characteristic. It extends from the base of the skull to the tip of the tail. Thus the three sets of arteries give rise to longitudinal chains of capillaries: the dorsal segmental arteries to the pial capillaries, the lateral arteries to the cardinal system, and the third set of dorso-lateral arteries to the capillary plexus along the myotomes. These capillary plexuses are exceedingly significant. For example, the primary capillary plexus along the dorso-lateral surface of the cord lies along the line in which the nerve-cells are multiplying to form the spinal ganglia; secondly, the longitudinal chain from the lateral arteries develops in response to the tubules of the Wolffian body; and, thirdly, the superficial dorso-lateral plexus in response to the myotomes. Throughout the study of the evolution of the vascular system the pattern of the sheets of capillaries is each time determined by the development of the tissues. The lateral vascular arch is not at first a segmental one, for the vein is the umbilical vein. The relation of the capillary plexus along the myotomes to the umbilical vein is shown in figure 6. The lateral arch, then, consists of dorso-lateral arteries which lead through a longitudinal chain of capillaries, along the lateral surface of the myotomes, into veins which are branches of the umbilical vein. In this vascular pattern the umbilical vein is destined to be replaced first by the posterior cardinal vein and permanently by the thoraco-epigastric, the internal mammary, the transverse lumbar veins, and the azygos system.

Two other points of interest may be noted in figure 6, namely, that there are anastomoses between the capillary plexus lateral to the myotomes and the capillary plexus of the cord, and that there is a tiny vein from the myotome-plexus to the spinal vein, so that these two primary vascular arches are already connected at this stage.

To sum up the circulation of the body-wall at the stage of 10 mm., there are in general two vascular arches, a spinal and a lateral arch. The spinal arch is segmental and consists of spinal arteries which lead through three capillary plexuses (namely, the plexus of the lateral surface of the cord, of the ventral surface, and of each ganglion) into a series of segmental veins which connect with the cardinal vein of the Wolffian body. The lateral arch consists of dorso-lateral arteries which drain through a longitudinal capillary plexus lateral to the myotomes, into a series of non-segmental branches of the umbilical vein.

The next stage in the development of the veins of the body-wall is the beginning of the thoraco-epigastric vein, as has been shown by Miss Smith. It is a longitudinal trunk which develops in the capillary plexus of the body-wall and joins the primitive ulnar vein when the embryo is about 12 mm. long. The thoraco-epigastric vein thus precedes the azygos system in development, for the latter does not begin until the embryo is about 14 mm. long. The position of the thoraco-epigastric vein with reference to the body-wall is plain in figure 8, plate 3; figure 10, plate 4; and figure 13, plate 6. It lies just ventral to the capillary

plexus of the body-wall and lateral to the ventral border of the myotomes. It is not in the thin lateral wall which contains the veins to the umbilical vein.

ORIGIN AND DEVELOPMENT OF THE AZYGOS SYSTEM AND THE LOWER SEGMENT OF THE INFERIOR VENA CAVA FROM A PREVERTEBRAL PLEXUS.

From this pattern of two vascular arches, a spinal and a lateral as a basis, the azygos veins must be followed. It will be noted in figure 6 that there are no vessels between the aorta and the ventral spinal plexus, that is, the area around the notochord is a non-vascular area; moreover, this remains a non-vascular area until the bodies of the vertebræ begin to differentiate. This differentiation begins in the neck region, and by the time the embryo is 11 mm. long there is an abundant prevertebral plexus in the neck. This is clearly shown in figure 6 of my articles of 1913. In figure 7, plate 3, a dissection of an injected embryo 14 mm. long, it will be seen that the prevertebral plexus of the cervical region extends into the dorsal region. This figure represents a ventral view of an embryo from which the heart, left Wolffian body, and left posterior cardinal vein have been removed. The right Wolffian body is shown as solid, since the India-ink injection made it so black as to preclude any analysis of its veins.

The cervical and upper dorsal prevertebral plexuses join both the cardinal veins and their tributaries, the spinal veins, in many places. Between these two chains of capillaries are the bodies of the vertebræ, so transparent in the specimen that the anterior spinal plexus shows faintly in the drawing. The double chain of capillaries, which is the anlage of the azygos system, shows in cross-section for about the same stage in figure 8, from an embryo 13.5 mm. long, the specimen being slightly further advanced than that of figure 7. This section passes through the upper half of the Wolffian bodies, where the organ is wide (see fig. 7), and shows within the Wolffian bodies only the transverse veins. On the right side of the figure the spinal artery joins the ventral spinal plexus; on the left, the section passes through the full length of a ventral spinal artery to the anterior spinal artery. On the left side the lateral spinal artery is clear. On neither side is the full course of a spinal vein shown, for the section passes through the intersegmental plexus; but on the right side a partial view of a spinal vein indicates their position. The point at which the spinal veins enter the Wolffian body is very clear on both sides, mesial to the edge of the body-cavity. Ventro-lateral to the bodies of the vertebra, along the spinal arteries, is a capillary plexus draining by many branches into the border of the Wolffian bodies, just lateral to the aorta. The section shows no indication of an azygos vein—merely the antecedent capillary plexus. It is important to notice the numerous connections in every segment of this capillary plexus with the vessels of the Wolffian body.

This section represents well the point of the change in the body-wall circulation due to the development of the thoraco-epigastric vein; it shows a vein still draining the myotome-plexus into the umbilical, but the new thoraco-epigastric vein lies in the body-wall and makes a very important chain in the lateral vascular arch. The group of the lateral arteries to the myotome-plexus is very plain. The section shows that the thoraco-epigastric vein precedes the azygos system, for the former is a large vein, while the azygos is still a capillary plexus. In this cross-section it can be seen that the subvertebral capillary plexus lies medial to the spinal vein. Its arteries are tiny branches of the spinal arteries which are best seen in the injections of silver nitrate. On the left side of this section three small veins connect this plexus with the border veins of the Wolffian body just lateral to the aorta. The sympathetic chain lies between the subvertebral or azygos plexus and the spinal veins.

As can be seen in figure 7, the azygos plexus at this stage, namely, at 14 mm., extends only three or four segments into the thoracic region. In this figure it is clear that from the

fifth segment caudalward the spinal veins are in a continuous sheet of vessels distinctly lateral to the plexus which is the anlage of the azygos. In this continuous plexus of vessels which enters the Wolffian body at its dorso-median angle, the spinal veins stand out only because they are a little larger than the rest. This lateral sheet of capillaries and veins is destined to develop very much and to become so important that it should be emphasized from the beginning (fig. 12). It indicates that the veins of the body-wall are far more numerous than the segmental veins. The subvertebral capillaries represent a third vascular arch for the body-wall, the first being the spinal, the second the lateral, and the third the subvertebral.

The first figure showing a definite azygos vein which develops out of this capillary plexus is seen in a dissection in figure 9, plate 4. The left Wolffian body, the entire left posterior cardinal vein, and hemiazygos vein are shown in place. The subvertebral plexus is much more highly developed, especially in the cervical region, and in the capillary plexus many definite veins are clearly seen. It is important to note that both the prevertebral cervical plexus and its continuation in the dorsal region have many more connections with the cardinal system than there are segments. The azygos system develops out of that part of the prevertebral system which is in the body region, and of the many connections with the cardinal vein that which is nearest the duct of Cuvier becomes the permanent one. This is true for both sides, and in the pig the duct of Cuvier is permanent on both sides. In the stage represented by figure 9 the duct of Cuvier is high up in the thorax, so that the vessels representing the accessory hemiazygos are a very short group connecting abundantly with the cervical plexus. In general the length of the azygos and of its corresponding superior intercostal is determined simply by the position of the duct of Cuvier. The lower end of the hemiazygos at this stage is opposite the third or fourth dorsal vertebra, where the vein breaks up into a subvertebral capillary plexus.

The azygos system which begins simply in response to the developing vertebræ becomes larger, because it establishes connections with the spinal veins and their new tributaries, intercostal veins. Moreover, this connection with the spinal veins takes place as the posterior cardinal system is becoming less important through being limited to the anterior part of the Wolffian body.

These new relations of the azygos system can be understood by comparing figure 13, plate 6, and figure 10, plate 4, one a dissection of a total specimen, the other a transverse section of approximately the same stage. It has been made clear that the azygos begins as a prevertebral plexus and that its marked increase in size is due to its secondary relations to the spinal and intercostal veins. By comparing figures 6 and 10 it will be seen that there has been a marked development of the veins of the body-wall as well as of the spinal veins. Figure 10 is a section of an injected embryo pig, 16 mm. long, cut transversely 250μ thick. The section passes through the anterior pole of the Wolffian body and shows that part of the organ which drains throughout its history into the posterior cardinal vein. It is well above the point of entrance of the vena cava into the liver (compare figure 2) and its veins do not drain into the vena cava. The posterior cardinal vein and the ventro-lateral vein are both shown. In the median position is the short median trunk, the anterior median vein shown in figure 2 for an earlier and in figure 4 for a later stage. In the series from which figure 10 is taken this vessel is short, measuring not more than 0.7 mm. It ends below by anastomosing with the esophageal vessels; above it joins the ventro-lateral vein and thence the posterior cardinal, figure 4. These short anterior median trunks are constant and can be found as long as the posterior cardinal veins persist. They lie in part ventro-lateral and in part directly lateral to the aorta. They anastomose with each other

freely ventral to the aorta, and are connected with the esophageal veins, with the veins of the Wolffian body, and with the azygos and hemiazygos veins. I think them important because they account so readily for variations in the azygos veins, such as the one reported by E. R. Clark (1915).

Turning now to the azygos veins themselves at this stage, namely, 16 or 17 mm., the veins are gradually extending caudalward and for about 5 segments have taken over the spinal and intercostal veins (fig. 13). At the same time it will be noticed that two new longitudinal veins, namely, the internal mammary and the thoraco-epigastric veins, are both larger than the azygos vein, and thus carry much the largest part of the blood from the body-wall back to the heart. For the upper thoracic segments, however, the azygos vein now takes much of the blood that formerly passed through the Wolffian bodies, there being only small connections with that organ. Below the level of the fifth segment, as seen in figure 13, the spinal veins and the abundant plexus of the body-wall form a continuous sheet of vessels which enter the Wolffian body lateral to the line of the azygos vein.

Certain relations of the azygos system are only to be made out in sections. As seen in figure 10, the subvertebral plexus is much further developed. There is now a capillary plexus of fine capillaries, mesial to the spinal arteries, resting on the bodies of the vertebrae, while lateral to the spinal arteries is a coarser plexus in which lie the azygos veins. This lateral plexus drains not only the subvertebral plexus, but connects with the spinal veins and with the exceedingly complex plexus from the body-wall as well.

In figure 10 will be noted a space just between each azygos vein and the small vessels from the plexus which enter the Wolffian body just at the edge of the body-cavity in the position of the original spinal veins. In this space runs the sympathetic chain, and thus it is clear that by means of the subvertebral plexus the spinal veins have been shifted from a position lateral to the sympathetic to the azygos veins which are medial to the sympathetic.

From figures 10 and 13 one can readily see that the circulation of the body-wall has now become exceedingly complex as compared with the two simple arches of the stage of 10 mm. Moreover, the pattern is very definite and is repeated for segment after segment. The pattern of each segment is only to be analyzed by following the pattern of the capillaries with reference to the developing tissues, the ribs, the intercostal muscles, and the musculature of the back.

The shifting of the spinal veins to the azygos vein is most plainly shown in figure 11, from an injected embryo 20 mm. in length. Here there is a very definite azygos vein which is shown passing beneath the right posterior cardinal vein. By means of the plexus shown in figure 10, the second, third, and fourth spinal veins, with all the plexus between, have clearly shifted to the azygos vein. The fifth spinal vein still enters the Wolffian body in the more lateral line, while the sixth runs to the azygos vein. The azygos vein ends in capillaries opposite the seventh segmental vein, which enters the Wolffian body directly. Thus it is clear that the azygos system receives at the stage of 20 mm. about 7 of the segmental veins.

The relations of the rest of the spinal veins at this stage are exceedingly interesting. It will be noted in figure 11 that the eighth and ninth join and run to the level of the tenth, where this common stem enters the Wolffian body in the primitive lateral line. This is simply an anomaly of this particular specimen and without especial significance. The position, however, of the tenth, eleventh, the combined stem of the twelfth and thirteenth, and the fourteenth is extremely interesting. From the primitive lateral position in which they entered the dorsal vein of the Wolffian body these vessels have shifted to a more medial position. Their relations can only be analyzed by means of sections. These spinal veins

now drain through an excessively complex venous plexus, either directly into the median mesonephritic vein or vena cava, or into its direct tributaries. This is clear in figure 12, from an embryo 20 mm. long. It is this venous plexus which surrounds the cisterna chyli at a slightly later stage and makes it practically impossible to get a pure lymphatic injection by direct puncture. Returning to figure 11, the fifteenth and sixteenth together and the seventeenth spinal vein still drain through the Wolffian body. Opposite the seventeenth segment is a transverse lumbar vein which drains into the Wolffian body. It is analogous to the thoraco-epigastric vein.

On the other hand, the common stem of the fibular and caudal veins, shown cut off in figure 11, no longer drains mainly into the veins of the Wolffian body as it did in the earlier stages (fig. 3), but has been shifted, by means of the subvertebral plexus shown in figure 12, to the median mesonephritic vein or the vena cava. The history of this process is best studied in thick serial sections of injected embryos. In embryo pigs up to 19 mm. long the common stem of the primitive fibular and caudal veins still enters remnants of the posterior cardinal vein in the dorso-median angle of the caudal pole of the Wolffian bodies. These remnants of the posterior cardinal vein connect the transverse veins (figs. 5 and 14) and join the vena cava. The caudal vein, however, connects freely with the prevertebral plexus, as shown, for a level farther cerebralward in figure 12. When the embryo pig is about 20 mm. long, the permanent kidney begins and lies against the posterior cardinal vein in the Wolffian body and at that time the anastomoses of the caudal vein with the prevertebral plexus develop to such an extent that more of the blood of the caudal veins passes through the prevertebral plexus mesial to the permanent kidneys than through the more lateral primitive pathway through the caudal pole of the Wolffian body. This change in the circulation is shown in the diagram of figure 14, which represents the conditions found in embryo pigs measuring from 20 to 27 mm. In the prevertebral plexus (as seen in figure 12) symmetrical longitudinal trunks develop lateral to the aorta, which shunt the blood from the caudal pole of the Wolffian body to the median mesonephritic vein. The diagram of figure 14 is given to analyze the large vein which represents the bifurcation of the vena cava at this stage. In the mid-line is the anastomosis of the two mesial cardinal veins and this central vein leads on either side into three main dorsal, transverse veins of the Wolffian body. The number of these great transverse veins is not constant, but they drain all but the cephalic pole of the organ. These transverse veins are connected along the dotted line of the diagram by remnants of the posterior cardinal veins, which are marked by crosses. A remnant of the posterior cardinal vein is shown passing ventral to the kidney. These remnants of the posterior cardinal veins (as can be seen in the diagram, or better in the actual sections) lie within the Wolffian body, distinctly lateral to the subvertebral plexus. They have the same position with reference to the Wolffian body as the posterior cardinal vein in figure 6, and when the Wolffian body disappears they disappear with it, as is indicated by the dotted line on figure 14. Thus the statement of Kerschner (1888, p. 813), referring to the lower segment of the vena cava, is entirely correct: "Ein medial und ventral von den Urnieren (den Nieren) gelagertes Gefäss kann den Cardinal Vene nicht entsprechen."

In the stages represented by figure 14 it can be said that symmetrical venæ cavæ empty into a large median vein which has remnants of the posterior cardinal vein along its sides; but when the Wolffian bodies disappear, only the median part of this great vein persists as a part of the vena cava; the more lateral part, consisting of the posterior cardinal veins and the transverse veins of the Wolffian bodies, disappears with that organ and hence the inferior segment of the inferior vena cava (which has been thought to be a persistent pos-

terior cardinal vein) is in reality a part of the prevertebral plexus and is more medial in position than the posterior cardinal vein ever is.

The diagram of figure 14 is from an embryo 24 mm. long and shows that the lower segment of the inferior vena cava is symmetrical up to this stage. By the time the embryo is 28 mm. long a very extensive anastomosis across the mid-line dorsal to the bifurcation of the aorta allows a shifting of the blood of the left side to an enlarged trunk on the right side and thus the asymmetrical right trunk of the postrenal inferior vena cava and the ascending lumbar veins are formed.

The significance of these changes associated with the prevertebral plexus lies in the decreasing circulation of blood through the Wolffian bodies all along the line. In the thoracic region the development of the azygos system in the prevertebral plexus has resulted in a shunting of the blood of the spinal and intercostal veins away from the cardinal system and in the abdominal region a much more extensive prevertebral vascular plexus accomplishes the same purpose. In the abdominal region this prevertebral plexus is certainly of great physiological significance. In the first place, it drains practically entirely into the part of the Wolffian body which belongs to the vena cava, and hence it might be called a prevertebral caval plexus. Its beginning is shown in a sheet of vessels in figure 7, from an embryo 14 mm. long, and still better in figure 13, from an embryo 17 mm. long, in which it can be seen that the plexus of vessels coming from the body-wall is very much more extensive than the spinal or segmental veins.

Figure 12 may be taken as a typical section of the prevertebral plexus of the abdominal region. By comparison with figure 10, which gives the prevertebral plexus of the thoracic region, it becomes clear that the abdominal plexus is an extraordinarily complex one. It fills in the entire region between the aorta and the vertebræ on the one hand, and between the aorta and the Wolffian bodies on the other, so that it is not only dorsal to the aorta but lateral as well. In the thoracic region it is the more medial part of the plexus which is best developed (fig. 10), while in the abdominal region it is the more lateral part (fig. 12). That the lateral part of the plexus is more important throughout the abdominal region is clearly indicated in the beginning of its development (as seen in figure 13), in which the two sheets of veins distinctly lateral to the azygos system have already been described. In this plexus the azygos and hemiazygos veins have a characteristic position, directly dorso-lateral to the aorta (fig. 10), while the developing vena cava is farther lateral. From the whole history of the azygos system it is clear that there is a prevertebral plexus throughout the embryo. In the abdominal region this prevertebral plexus becomes excessively complex. It may well be divided into three longitudinal zones—a zone cephalic to the median mesonephritic vein, a zone including the mesonephritic vein (fig. 12), and a zone caudal to the same vein. In the first zone, just cephalic to the median vein, the adrenal bodies develop in the area just lateral to the aorta. They, therefore, develop in an excessively vascular area. In the third abdominal zone, caudal to the median vein, the lower segment of the inferior vena cava develops also lateral to the aorta.

This history, then, enables one to complete the analysis of the inferior vena cava from the heart downward. The segment above the liver comes from the omphalo-mesenteric veins; within the liver from the omphalo-mesenteric veins and certain hepatic sinusoids; below the liver from the right mesial cardinal vein of the Wolffian body with its great median anastomosis; and below the kidneys from the prevertebral plexus. It thus becomes clear that the posterior cardinal vein, which early became incorporated in the Wolffian bodies, does not persist as a part of the vena cava. In fact, of the cardinal system below the duct of Cuvier, the only part that remains is the median anastomosis of the mesial

cardinal veins making that part of the vena cava which is opposite the renal veins in the adult; none of the posterior cardinal veins persists. Below the level of the renal veins the vena cava arises from the right prevertebral caval plexus. It connects freely with the veins of the Wolffian bodies as long as these organs persist. It thus becomes clear that the entire prevertebral plexus is an important structure. In the thoracic region the azygos system develops in the more medial part of the plexus, dorso-lateral to the aorta; in the lower abdominal region, the third segment of the inferior vena cava and the ascending lumbar veins develop from the more lateral part of the plexus, so that these veins must be considered as arising as longitudinal trunks of the same plexus. Thus a view of the prevertebral veins (such as is given in figure 495 of the *Spalteholz Handatlas der Anatomie*, Bd. II, Auflage 7, 1913) has this significance, that all of the prevertebral veins shown there, the azygos system, the ascending lumbar veins, and the inferior segment of the vena cava, have a common origin. The origin of the inferior vena cava, from the mesial cardinal veins and the prevertebral plexus, explains the well-known anastomoses of the vena cava in the adult.

No vein has a more extensive or a more interesting literature than the inferior vena cava. Our present ideas in regard to the vena cava may be said to begin with the work of Rathke, and the prevailing theory of the origin of the lower segment of the vein is the theory of Hochstetter. In 1830 Rathke discovered the fact that the lower segment of the inferior vena cava is double and symmetrical in the embryo. This was published in the *Merkel's Archiv* for 1830. In the same year he stated that the lower part of the inferior vena cava came from the right cardinal vein. His own words, as quoted by Kerschner, are: "Die Vene der rechten falschen Niere ist die nachherige hintere (untere) Hohlvene, die der linken die nachherige Vena hemiazyga." This view of the inferior vena cava is the same as that of Hochstetter. Rathke, however, in his subsequent work, published in 1838, gave up the theory that the lower segment of the inferior vena cava came from the posterior cardinal vein, because he had specimens in which two vessels were present, namely, a vessel medial to the kidney, making the anlage of the vena cava, and a vessel lateral to the kidney or the posterior cardinal vein (see Kerschner, p. 812). This is the condition shown in the diagram of figure 14. Notwithstanding this observation of Rathke, the work of Hochstetter (1893) has been practically universally accepted. Hochstetter studied the development of the entire vena cava in the rabbit. He described the development of the vena cava in the liver and based the study of the relation of the cardinal system to the liver veins on the work of Goette. It has already been noted that F. T. Lewis has cleared up this part of the subject by showing that it is the mesial cardinal or subcardinal vein which makes the connection with the liver. Hochstetter then developed the theory that the lower segment of the inferior vena cava is a transformed posterior cardinal vein. As can be seen in his figures, especially in his figure 19, Taf. 22, 1893, Hochstetter's view is merely a different interpretation of the same observations, for, in the same specimen, he shows both an inferior vena cava mesial to the kidney and a posterior cardinal vein lateral to the kidney.

In 1888 Kerschner analyzed the views of Rathke and Hochstetter and concluded that the lower segment of the inferior vena cava could not be a transformed posterior cardinal vein for two reasons: first, the vena cava has a position more mesial and more ventral than the posterior cardinal ever has; and secondly, at a certain stage both veins are present in the same specimen. This sums up the whole question, the facts being that the lower segment of the inferior vena cava is at first double and comes from the bilateral prevertebral plexus and that this new pathway takes the place of the posterior cardinal system which

becomes incorporated in the Wolffian body and disappears with that organ. Subsequently the lower segment of the vena cava becomes unilateral. The fact that the lower segment of the vena cava comes from a prevertebral plexus has also been observed by Huntington and McClure (1907) in a study of the development of the veins in the cat. They have called the prevertebral plexus a supracardinal system of veins.

The entire point at issue in the development of the azygos system is the place of its permanent connection with the cardinal system. The belief has been that it lies opposite the tenth vertebra, but as a matter of fact it lies at the duct of Cuvier. The crucial point for distinguishing the azygos veins from the posterior cardinal veins lies in the more dorsal position of the azygos veins. It has been shown that the azygos plexus has a great number of connections with the cardinal system, anterior as well as posterior. At first the cardinal veins are enormous and the azygos veins tiny. At last there comes a stage in which there are two veins of equal size draining into the duct of Cuvier, a dorsal vein or the azygos, and a ventral vein or the posterior cardinal. This is clearly shown in figure 15, plate 6, from an embryo measuring 22 mm. The fact that the azygos vein is farther dorsal than any portion of the posterior cardinal vein is the crucial point in distinguishing the two veins in sections. This is best shown in figure 5. Since the posterior cardinal vein becomes incorporated in the Wolffian body it necessarily lies as far ventral as that organ. Starting from the stage of from 21 to 22 mm., when the two veins are of the same size, the more dorsal vein (the azygos) increases in size, especially at the anterior end, and the more ventral vein begins to be dragged caudalward, becoming a tributary of the azygos vein. This is well shown in figure 4, from an embryo 23 mm. long. On the right side the dorsal vein (or the azygos) is the only one of the two which connects directly with the duct of Cuvier. Without a figure of the preceding stage in which the two veins are equal (fig. 15, plate 6) it would not be easy to prove from figure 4 alone that the posterior cardinal is really now a tributary of the azygos vein. The point, however, is readily proved from serial sections, because in them it is perfectly clear that it is the more dorsal of the two veins that finally joins the duct of Cuvier. In the specimen from which figure 4 is taken the azygos vein is a distinct vessel up to a point half-way between the two leaders *v. A'* and *v. C. P.*, where the more dorsally placed azygos vein receives the posterior cardinal vein. The deep shadow on the vein obscures this point in the figure.

The right posterior cardinal vein then joins the azygos in figure 4 at the point where the azygos curves outward to join the duct of Cuvier. Comparing this with figure 15, where the two veins are equal and both enter the duct of Cuvier, it is plain that in the stage of figure 4 the posterior cardinal is being dragged backward, becoming thereby a branch of the azygos. On the left side of figure 4 the hemiazygos and posterior cardinal both join the duct of Cuvier, showing that the left side is not quite as far developed as the right.

The more dorsal position of the hemiazygos is especially clear in figure 4. The fundamental points of the azygos system are all shown in this figure. Both the right and the left azygos veins occupy a dorsal position and empty into the duct of Cuvier. The ladder-like pattern of the two azygos veins, which was noted by Hochstetter, is very clear. Draining into the azygos vein is a small descending vein which I shall call the right oblique vein. Its meaning and further development are clear in figures 17 and 18, plate 7. It drains the prevertebral tissues of the first four segments in the pig and is about as long as the accessory hemiazygos (fig. 17). It is usually larger than the hemiazygos and thus drains more than half of the prevertebral tissue. In figure 16 it is, however, slightly smaller than the hemiazygos. It is not the superior intercostal, which lies farther forward and drains into the azygos at the duct of Cuvier. It is a special branch of the azygos vein characteristic

of the pig. Its interest is increased by the fact that Kampmeier (1912) thought that it disappeared and was replaced by the thoracic duct. The thoracic duct does develop along the course of this vein and Kampmeier stated that beyond the stage of 23 mm. (see fig. 4) this vein disappeared. A glance at figure 17 (from a pig 28 mm. long) and again at figure 18 (from a pig 40 mm. long) will show at once that it is on the contrary a developing vein.

The two figures of the stage measuring 28 mm. (namely figures 16 and 17) show a number of important points: first, the relative and marked development of the right oblique vein and the left descending azygos (accessory hemiazygos); secondly, the dragging of both right and left posterior cardinal veins along the azygos veins as the Wolffian body comes to lie farther and farther caudalward. It is now much plainer that the posterior cardinals are becoming tributaries of the azygos system than it was in figure 5. Figure 16 is intended to show that the left descending azygos (accessory hemiazygos) is present alongside of the anterior cardinal to the duct of Cuvier and that it lies dorsal to the anterior cardinal.

The essential characteristics of the azygos veins are also shown in figure 18 from a specimen measuring 40 mm. This particular injection shows a variation of the usual pattern in the pig, which is that the right and left veins are about equal, as in figure 17. In figure 18, however, the marked anastomosis of the two veins, which is pretty constant opposite the eighth to the tenth ribs (see fig. 17), has become very large, and below that point a single trunk represents both veins.

The development of the azygos system makes its nomenclature very simple: On either side the azygos opens into the duct of Cuvier. According to the position of the duct of Cuvier there is a short descending branch, the so-called superior intercostal and accessory hemiazygos, and a long ascending branch, the so-called azygos and hemiazygos. For the pig, where both ducts of Cuvier are permanent, the only nomenclature necessary is ascending and descending right and left azygos veins, together with the special branch, the right oblique vein.

CONCLUSIONS.

This study has demonstrated that the posterior cardinal veins disappear with the Wolffian bodies. They are not transformed either into a part of the vena cava or into a part of the azygos veins. They develop along the edge of the Wolffian body and disappear with that organ. The vena cava is primarily a vein to drain the Wolffian bodies, and, being formed from the omphalo-mesenteric vein within the liver, and from the mesial cardinal vein below the liver, may be said to be foreshadowed in the primitive venous system of the embryo. Subsequently, as the Wolffian bodies disappear the lower segment of the vena cava develops from a prevertebral caval plexus by which the caudal veins and veins of the legs become shifted from the Wolffian bodies to the vena cava.

The azygos veins are new prevertebral veins, representing a vascular arch between the spinal arteries and the cardinal system of veins. They drain into the anterior and the posterior cardinal veins by very numerous connections. Of the many connections the ones which remain as the permanent ones are those opposite the ducts of Cuvier, and hence no part of the posterior cardinal vein is incorporated in the azygos system. The position of the duct of Cuvier in the adult determines the length of the ascending and descending branches. The more dorsal position of the azygos system throughout its development enables one to distinguish it from the cardinal system at every stage. The development of the azygos system enables one to simplify its nomenclature into right and left ascending and descending azygos veins.

BIBLIOGRAPHY.

- CLARK, E. R.: An anomaly of the thoracic duct with a bearing on the embryology of the lymphatic system. 8°. Washington, 1915. (Carnegie Inst. Washington, Pub. No. 222.)
- CLARK, ELEANOR LINTON: Injection and reconstruction of the jugular lymph sac in the chick. *Anat. Record*, Philadelphia, 1912, vi, 261-264.
- CLARK, JOHN G.: The origin, development, and degeneration of the blood-vessels of the human ovary. *Contrib. sc. med. . . . pupils of W. H. Welch*, Baltimore, 1900, 593-676, 5 pl. *Also*: Johns Hopkins Hosp. Rep., Baltimore, 1900, ix, 593-676, 5 pl.
- DANDY, W. E.: A human embryo with seven pairs of somites measuring about 2 mm. in length. *Amer. Journ. Anat.*, Philadelphia, 1910, x, 85-108, 6 pl.
- DAVIS, D. M.: Studies on the chief veins in early pig embryos and the origin of the vena cava inferior. *Amer. Journ. Anat.*, Philadelphia, 1910, x, 461-472, 6 pl.
- EVANS, H. M.: On the earliest blood vessels in the anterior limb buds of birds and their relation to the primary subclavian artery. *Amer. Journ. Anat.*, Philadelphia, 1909, ix, 281-319, 9 pl.
- On the development of the aorta, cardinal and umbilical veins, and the other blood vessels of vertebrate embryos from capillaries. *Anat. Record*, Philadelphia, 1909, iii, 498-518.
- Die Entwicklung des Blutgefäßsystems. *Handb. d. Entwicklungsgesch. d. Menschen*, (Keibel und Mall), Leipzig, 1911, ii, 551-688. *Also, transl.*: *Man. Human Embryol.* (Keibel and Mall), Philadelphia, 1912, ii, 570-709.
- FLINT, J. M.: The blood vessels, angiogenesis, organogenesis, reticulum, and histology of the adrenal. *Contrib. sc. med. . . . pupils of W. H. Welch*, Baltimore, 1900, 153-228, 8 pl. *Also*: Johns Hopkins Hosp. Rep., Baltimore, 1900, ix.
- GOETTE, A.: Die Entwicklungsgeschichte der Unke. 8°. Leipzig, L. Voss, 1875.
- GRAFE, E.: Beiträge zur Entwicklung der Urniere und ihrer Gefäße beim Hühnchen. *Arch. f. mikr. Anat.*, Bonn, 1906, LXVII, 143-230, 5 pl.
- GROSSER, O.: Die Elemente des Kopfvenensystems der Wirbeltiere. *Anat. Anz.* (Verhandl. d. anat. Gesellsch.), Jena, 1907, xxx, 179-192.
- HOCHSTETTER, FR.: Ueber die Bildung der Hohlvene bei den Säugethieren. *Anat. Anz.*, Jena, 1887, ii, 517-520.
- Beiträge zur Entwicklungsgeschichte des Venensystems der Amnioten. *Morphol. Jahrb.*, Leipzig, 1887, 8, xiii, 575-585, 1 pl.
- Zur Morphologie der Vena Cava inferior. *Anat. Anz.*, Jena, 1888, iii, 867-872.
- Ueber die hintere Hohlvene. *Verhandl. d. anat. Gesellsch.* (Wien), Jena, 1892, vi, 181.
- Beiträge zur Entwicklungsgeschichte des Venensystems der Amnioten. ii. Reptilien, *Morphol. Jahrb.*, Leipzig, 1892-3, xix, 428-501, 3 pl.
- Beiträge zur Entwicklungsgeschichte des Venensystems der Amnioten, iii. Säuger, *Morphol. Jahrb.*, Leipzig, 1893, xx, 543-648, 3 pl.
- Entwicklung des Venensystems der Wirbeltiere. *Anat. Hefte*, 2 Abt., Wiesbaden, 1894, iii, 460-489.
- Die Entwicklung des Blutgefäßsystems. *Handb. d. vergleich. u. exper. Entwicklungslehre d. Wirbeltiere* (Hertwig), Jena, 1903, iii, 2 Teil, 1-166.
- HOFFMANN, C. K.: Zur Entwicklungsgeschichte des Venensystems bei den Schachiern. *Morphol. Jahrb.*, Leipzig, 1893, xx, 289-304, 1 pl.
- HUNTINGTON, G. S.: The genetic principles of the development of the systemic lymphatic vessels in the mammalian embryo. *Anat. Record*, Philadelphia, 1910, iv, 399-424, 18 pl.
- HUNTINGTON, G. S., and C. F. W. McCURE: Development of the postcava and tributaries in the domestic cat. *Anat. Record*, Philadelphia, 1906-7, i, 29. *Also*: *Amer. Journ. Anat.*, Baltimore, 1906-7, vi, Suppl., 29.
- JACOBSON, L. L.: Sur l'anatomie et la physiologie d'un système veineux, particulier aux reptiles. *Bull. de la Soc. philomat.*, Paris, 1812-13, iii, 259-262.
- KAMPMEIER, O. F.: The development of the thoracic duct in the pig. *Amer. Journ. Anat.*, Philadelphia, 1912, xiii, 401-464, 5 pl.
- KERSCHNER, L.: Zur Morphologie der Vena Cava inferior. *Anat. Anz.*, Jena, 1888, iii, 808, 943.
- KNOWER, H. McE.: A new and sensitive method of injecting the vessels of small embryos, etc., under the microscope. *Anat. Record*, Philadelphia, 1908, ii, 207-214.
- MALL, F. P.: On the development of the blood vessels of the brain in the human embryo. *Amer. Journ. Anat.*, Baltimore, 1901-5, iv, 1-18, 3 pl.
- LEWIS, F. T.: The development of the vena cava inferior. *Amer. Journ. Anat.*, Baltimore, 1901-02, i, 229-244, 2 pl.
- MACCALLUM, J. B.: Notes on the Wolffian body of higher mammals. *Amer. Journ. Anat.*, Baltimore, 1901-2, i, 245-259.
- MACCALLUM, W. G.: Die Beziehung der Lymphgefäße zum Bindegewebe. *Arch. f. Anat. u. Physiol.*, Anat. Abt., Leipzig, 1902, 273-291. *Also, transl.*: Johns Hopkins Hosp. Bull., Baltimore, 1903, xiv, 1-9.
- McCURE, C. F. W.: A contribution to the anatomy and development of the venous system of *Didelphys marsupialis* (L.). *Amer. Journ. Anat.*, Baltimore, 1906, v, 163-226, 5 pl.
- The postcava of an adult Indian chevrotain (*Tragulus meminna* Erxleben). *Anat. Anz.*, Jena, 1906, xxix, 375-377.
- MILLER, A. M.: The development of the postcaval vein in birds. *Amer. Journ. Anat.*, Baltimore, 1902, 3, ii, 283-298.
- MINOT, C. S.: On the veins of the Wolffian bodies in the pig. *Proc. Boston Soc. Nat. Hist.*, 1898, xxviii, 265-274.
- On a hitherto unrecognized form of blood circulation without capillaries in the organs of vertebrata. *Proc. Boston Soc. Nat. Hist.*, 1900, xxix, 185-215.
- PARKER, G. H., and C. H. TOZIER: The thoracic derivatives in the posterior cardinal veins of swine. *Bull. Mus. Compar. Zool. Harvard College*, Cambridge, 1897-98, xxxi, No. 6, 133-144.
- POPOFF, DEMETRIUS: Die Dottersack-Gefäße des Huhnes. 8°. Wiesbaden, C. W. Kreidel's Verlag, 1891.
- RABL, C.: Ueber die Entwicklung des Venensystems der Schachier. *Festschr. z. 70. Geburtstage Leuckarts*, 8°. Leipzig, W. Engelmann, 1892.
- RATKE, H.: Ueber die früheste Form und die Entwicklung des Venensystems und der Lungen beim Schafe. *Arch. f. Anat. u. Physiol.* (Meckel's), Leipzig, 1830, v, 63-73.
- Abhandlungen zur Bildungs- und Entwicklungsgeschichte des Menschen und der Tiere. Erster Theil. 4°. Leipzig, F. C. W. Vogel, 1832.
- Der Bau und die Entwicklung des Venensystems der Wirbeltiere. Bericht u. d. Naturwissensch. Seminar d. Univ. Königsberg, 1838, iii, 168-170.
- SABIN, F. R.: On the origin of the duct of Cuvier and the cardinal veins. *Anat. Record*, Philadelphia, 1915, ix, 115-117.
- Der Ursprung und die Entwicklung des Lymphgefäßsystems. *Ergebn. d. Anat. u. Entwicklungsgesch.*, Wiesbaden, 1913, xxi, 1-98. *Also transl.*: The origin and development of the lymphatic system. Johns Hopkins Hosp. Rep., Monographs, New Series, No. 5, Baltimore, 1913, 1-94.
- SMITH, HELEN W.: On the development of the superficial veins of the body wall in the pig. *Amer. Journ. Anat.*, Philadelphia, 1909, ix, 439-462.
- SPALTEHOLZ, W.: Ueber das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten. 8°. Leipzig, S. Hirzel, 1911. Second edition, 1914.
- TILNEY, F.: The development of the axial veins and lymphatics in *Tragulus meminna* Erxleben. *Amer. Journ. Anat.*, Philadelphia, 1912-13, xiii, 193-221, 13 pl.
- ZUMSTEIN, J.: Zur Entwicklung des Venensystems bei dem Meerschweinchen. *Anat. Hefte*, 1 Abt., Wiesbaden, 1897, viii, 165-190, 10 pl.
- Zur Anatomie und Entwicklung des Venensystems des Menschen. *Anat. Hefte*, 1 Abt., Wiesbaden, 1895, 1895-6, vi, 571-608, 2 pl.

EXPLANATION OF PLATES.

PLATE 1.

- Fig. 1. Embryo pig 9 mm. long (about the stage of fig. 12 in Keibel's *Normaltafeln, Das Schwein*), in which the veins of the right Wolffian body have been injected with silver nitrate. This is a stage before the tail has curved and hence the specimen is younger than the one of fig. 2, which measures less. Cleared by the Spalteholz method. $\times 11$. v. c., v. caudalis; v. c. m., v. cardinalis mesialis at the point at which it curves dorsalward to join the v. cardinalis posterior; v. c. p., v. cardinalis posterior; v. t. l., v. transversa lateralis of the Wolffian body; v. t. m., v. transversa mesialis of the Wolffian body; v. v., v. ventralis of the Wolffian body.
2. Dissection of an embryo pig 8 mm. long, in which the veins have been injected with silver nitrate through the anterior cardinal vein. The left Wolffian body has been dissected away so that the mesial surface of the right Wolffian body is exposed. Cleared by the Spalteholz method. $\times 11$. v. c. p., v. cardinalis posterior; v. c. m., v. cardinalis mesialis at the point of the anastomosis of the veins of the two sides, which is also the point where the v. cardinalis mesialis dextra curves ventralward to the liver; v. m. a., v. mesialis anterior of the Wolffian body; v. om., omphalo-mesenterica; v. s., v. spinalis; v. t. m., v. transversa mesialis of the Wolffian body; v. u., v. umbilicalis; v. v., v. ventralis of the Wolffian body.
3. Embryo pig 11 mm. long, in which the veins have been injected with silver nitrate, showing the left Wolffian body and through it the right mesial cardinal vein. Cleared by the Spalteholz method. $\times 11$. v. c. m., v. cardinalis mesialis; v. c. p., v. cardinalis posterior; v. f. p., v. fibularis primitiva; v. t. m., v. transversa mesialis belonging to the left Wolffian body; v. t. l., v. transversa lateralis of the Wolffian body; v. u., v. umbilicalis; v. v., v. ventralis of the Wolffian body.
4. Dissection of an embryo pig 23 mm. long, in which the veins have been injected with silver nitrate. Cleared by Spalteholz method. $\times 10$. d. c., ductus Cuvier; v. a., v. azygos; v. a', v. azygos above the point where it is joined by the v. cardinalis posterior; v. c. p., v. cardinalis posterior; v. c. p', v. cardinalis posterior within the Wolffian body; v. i., anastomosis which is the forerunner of the v. innominata; v. m. a., v. mesialis anterior of the Wolffian body; v. m. i., v. mammaria interna; v. te., v. thoraco-epigastrica; v. t. l., v. transversa lateralis making the mainroot of the vena cava within the Wolffian body; v. u. p., v. ulnaris primitiva; v. v., v. ventralis of the Wolffian body; w. b. i., Wolffian body, inner glomerular zone.

PLATE 2.

5. Embryo pig 22 mm. long, in which the veins have been injected with silver nitrate, and the entire embryo cleared by the Spalteholz method. $\times 11$. v. a., v. azygos; v. b., common stem of the v. fibularis primitiva and the v. caudalis which empties into the median mesonephritic vein and which becomes the lower segment of the vena cava inferior; v. c., v. caudalis; v. c. a., v. cardinalis anterior or v. jugularis interna; v. c. p., v. cardinalis posterior; v. c. i., v. cava inferior; v. f. p., v. fibularis primitiva; v. j. e., v. jugularis externa; v. l. t., v. lumbalis transversa; v. m. i., v. mammaria interna; v. t. l., v. transversa lateralis of the Wolffian body making the main roots of the vena cava; v. te., v. thoraco-epigastrica; v. u. p., v. ulnaris primitiva; w. b., Wolffian body.

PLATE 3.

6. Transverse section of an embryo pig 9.5 mm. long in which the entire vascular system has been injected with India-ink through the umbilical artery. The section is unstained and is $250\ \mu$ thick. It passes through the lower half of the Wolffian body and is to be compared with fig. 2. $\times 36$. a., aorta; g. s., position of a ganglion spinale; v. c. p., v. cardinalis posterior; v. c. m., v. cardinalis mesialis; v. t. m., v. transversa mesialis of the Wolffian body, connecting the v. cardinalis posterior with the v. cardinalis mesialis; v. t. v., v. transversa ventralis of the Wolffian body, the leader being at the position of the v. ventralis at a little later stage; v. s., v. spinalis; v. u., v. umbilicalis; w. d., Wolffian duct.
7. Dissection of an embryo pig 14 mm. long in which the vascular system has been injected with India ink through the umbilical artery. The left Wolffian body has been removed, the right one is in place. $\times 20$. a. s., a. spinalis; d. c., ductus Cuvier; p. p., prevertebral plexus of veins from the body-wall and from the spinal cord entering the Wolffian body in a sagittal plane lateral to the v. hemiazygos, the lower part of which plexus becomes a prevertebral caval plexus; v. a., v. azygos in the form of its antecedent capillary plexus; v. m. i., v. mammaria interna; v. j. e., v. jugularis externa; v. te., v. thoraco-epigastrica.
8. Transverse section of an embryo pig 13.5 mm. long in which the vascular system has been injected with India-ink through the umbilical artery. The section passes through the cephalic half of the Wolffian body and is to show the prevertebral capillary plexus in which the v. azygos and the v. hemiazygos develop. The section is unstained and is $250\ \mu$ thick. It is about the stage of the specimen in fig. 7. $\times 40$. a., aorta; a. s., a. spinalis; p. v. a., plexus in which the vena azygos develops; v. b., vein of the body-wall; v. te., v. thoraco-epigastrica; v. s., v. spinalis; v. t., v. transversa of the Wolffian body; x., plexus of capillaries lateral to the myotome.

PLATE 4.

- FIG. 9. Dissection of an embryo pig 16 mm. long in which the vascular system has been injected with India ink through the umbilical artery. The specimen shows the prevertebral plexus of the cervical and upper dorsal region with the developing v. hemiazygos. $\times 18$. d. c., ductus Cuvier; v. ha., v. hemiazygos; v. j. e., v. jugularis externa; v. te., v. thoraco-epigastrica.
10. Transverse section of an embryo pig 16 mm. long in which the vascular system has been injected with India ink through the umbilical artery. The section passes through the cephalic pole of the Wolffian body and is to show the relation of the v. azygos to the prevertebral plexus. The section is unstained and is $250\ \mu$ thick. It is about the stage of fig. 13. $\times 34$. a., aorta; v. c. p., v. cardinalis posterior within the Wolffian body; v. ha., v. hemiazygos; v. m. a., v. mesialis anterior of the Wolffian body; v. m. i., v. mammaria interna; v. te., v. thoraco-epigastrica; v. v., v. ventralis of the Wolffian body; w. b., Wolffian body.

PLATE 5.

11. Dissection of an embryo pig 20 mm. long in which the vascular system has been injected with India ink through the umbilical vein. All of the viscera have been removed. $\times 20$. a., aorta; v. a., v. azygos; v. b., common stem of the v. fibularis primitiva and the v. caudalis which becomes the lower segment of the vena cava; v. c. p., v. cardinalis posterior; v. l. t., v. lumbalis transversa; v. s. 2, v. spinalis of the second segment; v. te., v. thoraco-epigastrica; v. u. p., v. ulnaris primitiva.
12. Transverse section of an embryo pig 20 mm. long in which the vascular system has been injected with India ink through the umbilical artery. The section is to show the prevertebral plexus and passes through the median mesonephritic vein. The section is unstained and is $250\ \mu$ thick. $\times 77$. a., aorta; a. s., a. spinalis, which is now a branch of a single dorsal segmental artery; p. p., prevertebral plexus at the position of the future azygos vein, the limit of the development of the v. azygos for this stage being shown in fig. 11; p. p', prevertebral plexus at the point in which the third segment of the inferior vena cava and the corresponding ascending lumbar vein develop at the level below the median mesonephritic vein; p. p. v., prevertebral plexus of small veins resting on the vertebra; v. m. m., v. mediana mesonephritica, the anastomosis across the mid-line of the embryo of the two vv. cardinalis mesiales; v. t. m., v. transversa mesialis of the Wolffian body.

PLATE 6.

13. Dissection of an embryo pig 17 mm. long in which the vascular system has been injected with India ink through the umbilical artery. $\times 21$. a., aorta; d. c., ductus Cuvier; p. p., prevertebral plexus which receives veins from the body-wall and from the spinal cord and drains into the Wolffian body in a sagittal plane lateral to the hemiazygos vein; v. ha., v. hemiazygos; v. m. i., v. mammaria interna; v. te., v. thoraco-epigastrica.
14. Diagram from the embryo pig measuring 24 mm. long to show the relations of the symmetrical segments of the inferior vena cava to the median mesonephritic vein and to the remnants of the posterior cardinal vein in stages measuring from 20 to 27 mm. long. The parts of the large median vein marked with a cross are from the posterior cardinal vein. The dotted lines separate the part of the median vein which persists from that which disappears with the Wolffian body. a., aorta; k., kidney; v. c., v. caudalis; v. c. i., vena cava inferior; v. c. i. l., vena cava inferior, lower segment; v. f. p., v. fibularis primitiva; v. m. m., v. mediana mesonephritica; v. t., v. transversa of the Wolffian body.
15. Dissection of an embryo pig 20 mm. long, a little younger than the specimen of figs. 4 and 5. The specimen has been injected with silver nitrate through the veins and is to show the stage at which the v. azygos and the v. cardinalis posterior are equal in size and both empty into the duct of Cuvier. $\times 8$. d. c., ductus Cuvier; v. a., v. azygos; v. c. a., v. cardinalis anterior or v. jugularis interna; v. c. i., vena cava inferior; v. c. p., v. cardinalis posterior; v. j. e., v. jugularis externa; v. te., v. thoraco-epigastrica; w. b., Wolffian body.

PLATE 7.

16. Injection of the veins in an embryo pig 28 mm. long to show the relation of the v. hemiazygos accessoria to the caudal part of the v. cardinalis sinistra which still persists at this stage. $\times 17$. d. c., ductus Cuvier; v. a., v. azygos; v. c. a., v. cardinalis anterior; v. c. p., v. cardinalis posterior; v. ha., v. hemiazygos; v. ha. a., v. hemiazygos accessoria; v. o., oblique vein which is a branch of the v. azygos; w. b., Wolffian body.
17. Dissection of an embryo pig 28 mm. long in which the vascular system has been injected with India ink through the umbilical artery. The specimen shows the azygos and hemiazygos veins and their relation to the disappearing vv. cardinales posteriores. $\times 20$. v. a., v. azygos; v. c., common stem of the v. ulnaris primitiva and the v. thoraco-epigastrica; v. c. a., v. cardinalis anterior; v. c. p., v. cardinalis posterior; v. ha. a., v. hemiazygos accessoria; v. o., oblique vein which is a branch of the v. azygos; w. b., Wolffian body.
18. Dissection of an embryo pig 40 mm. long in which the vascular system has been injected with India ink through the umbilical artery. View of the v. azygos and v. hemiazygos. $\times 26$. v. a., v. azygos; v. ha., v. hemiazygos; v. ha. a., v. hemiazygos accessoria; v. o., oblique vein which is a branch of the v. azygos.

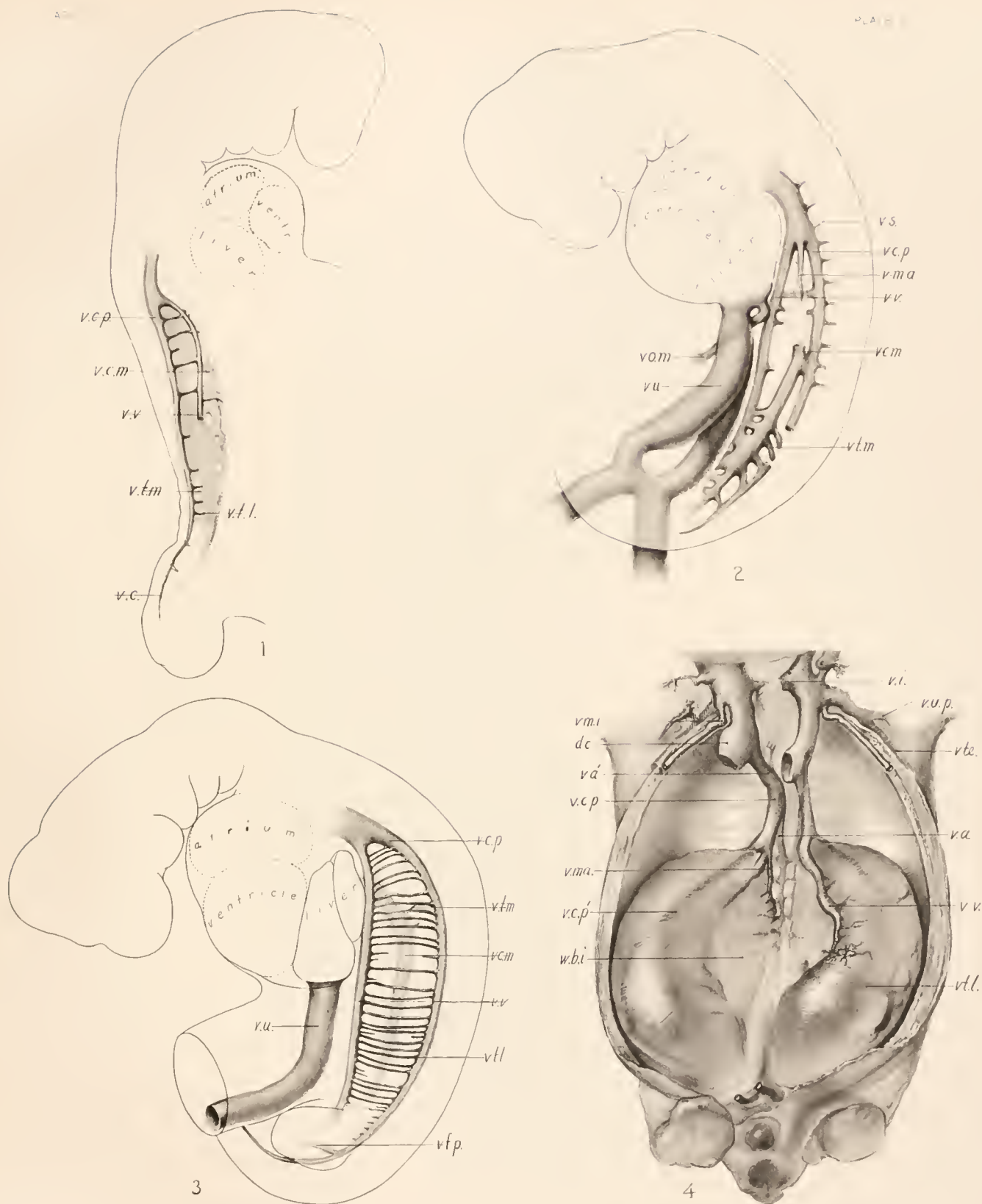


Fig. 1. Veins of the Wolffian body in an embryo pig 9 mm. long.

Fig. 2. Veins of the Wolffian body in an embryo pig 8 mm. long.

Fig. 3. Veins of the Wolffian body in an embryo pig 11 mm. long.

Fig. 4. Veins of an embryo pig 23 mm. long.

The detailed description of the figures will be found on pages 31, 32.

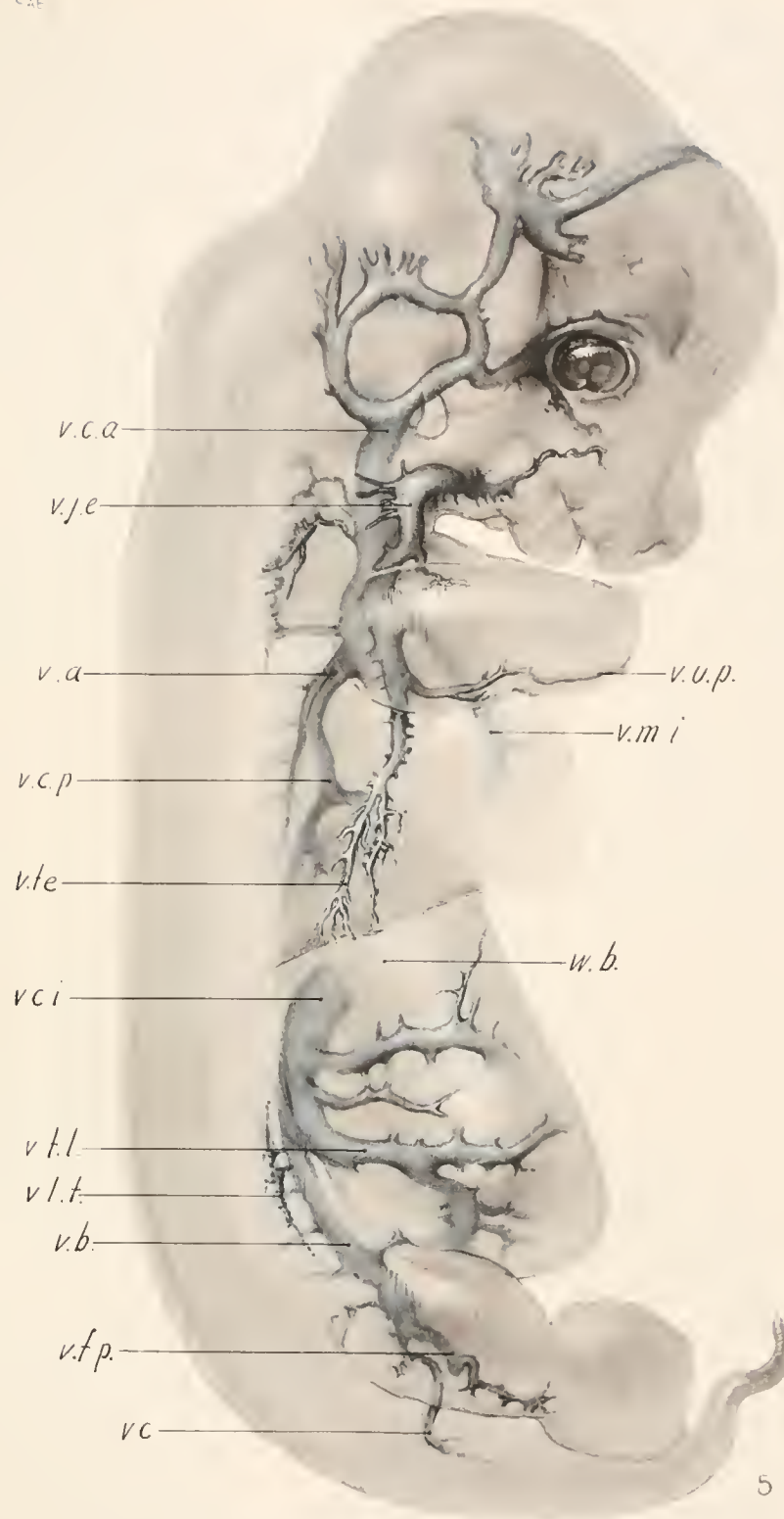
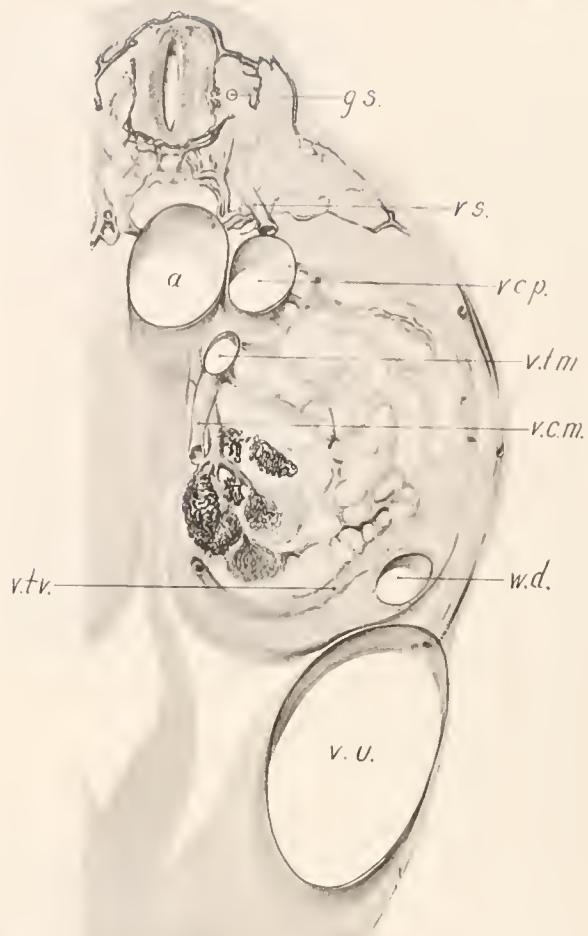


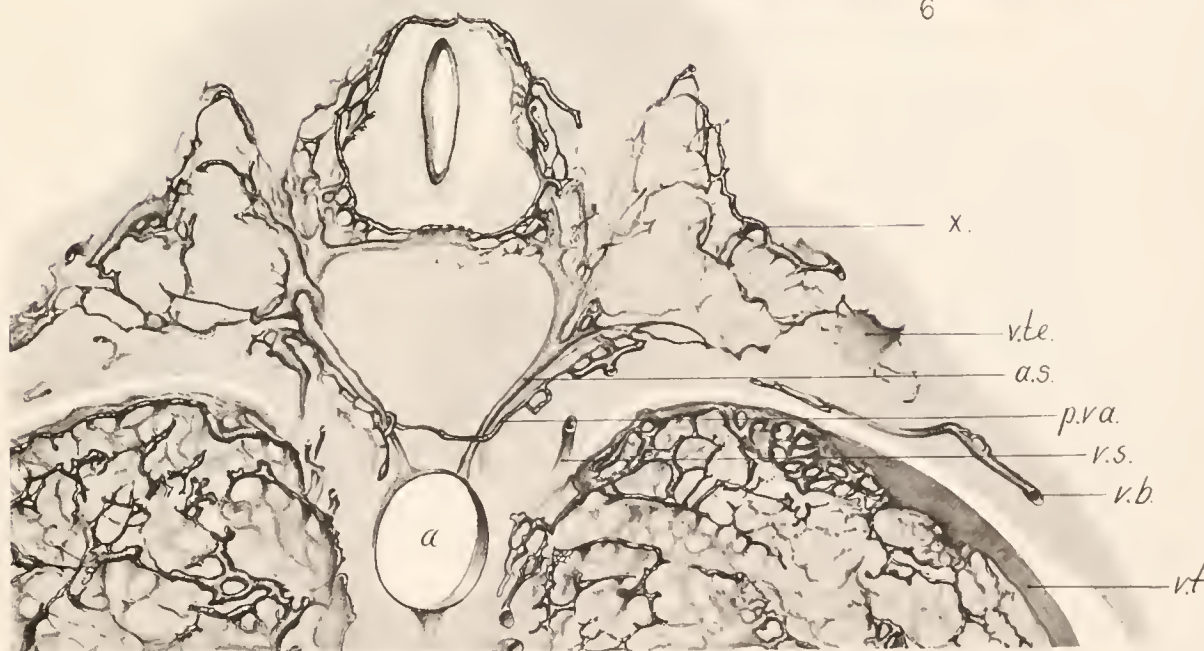
Fig. 5. Veins of an embryo pig 22 mm. long.



7



6



8

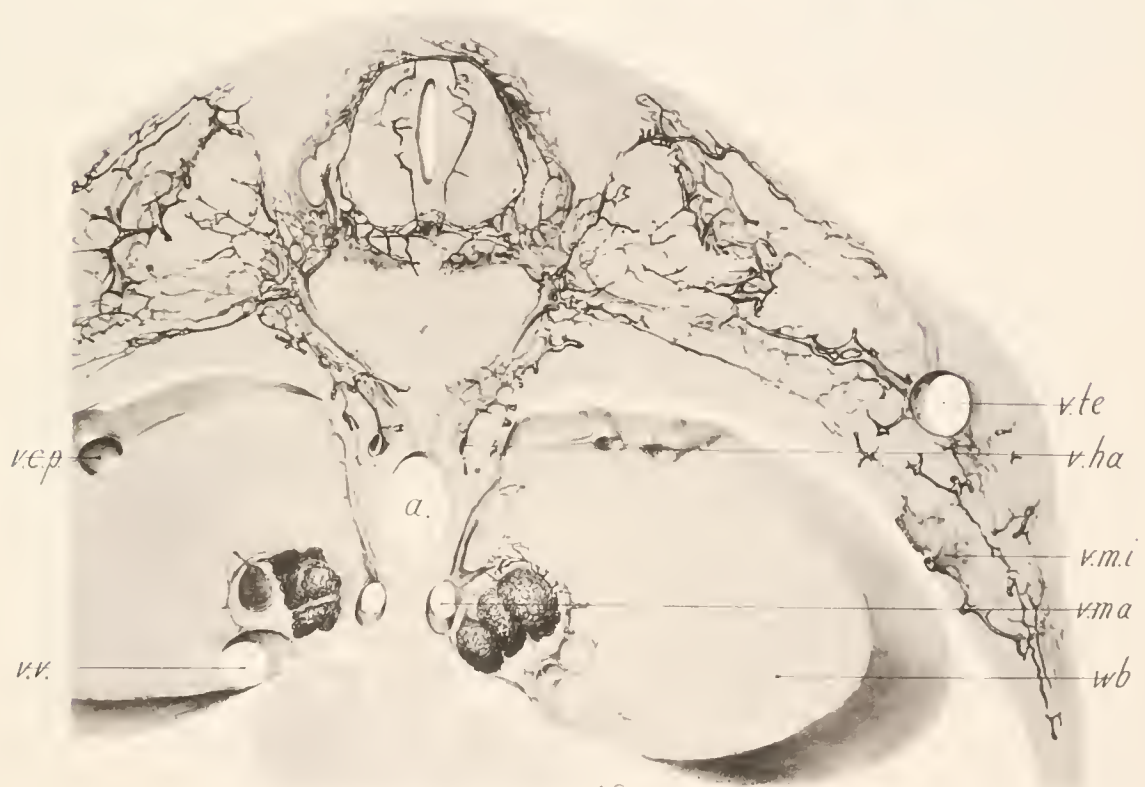
Fig. 6. Section of an injected embryo pig 9.5 mm. long passing through the lower half of the Wolffian body.

Fig. 7. Dissection of an injected embryo pig 14 mm. long, to show the capillary plexus which precedes the azygos veins.

Fig. 8. Section of an injected embryo pig 13.5 mm. long showing the capillary plexus which precedes the azygos veins.



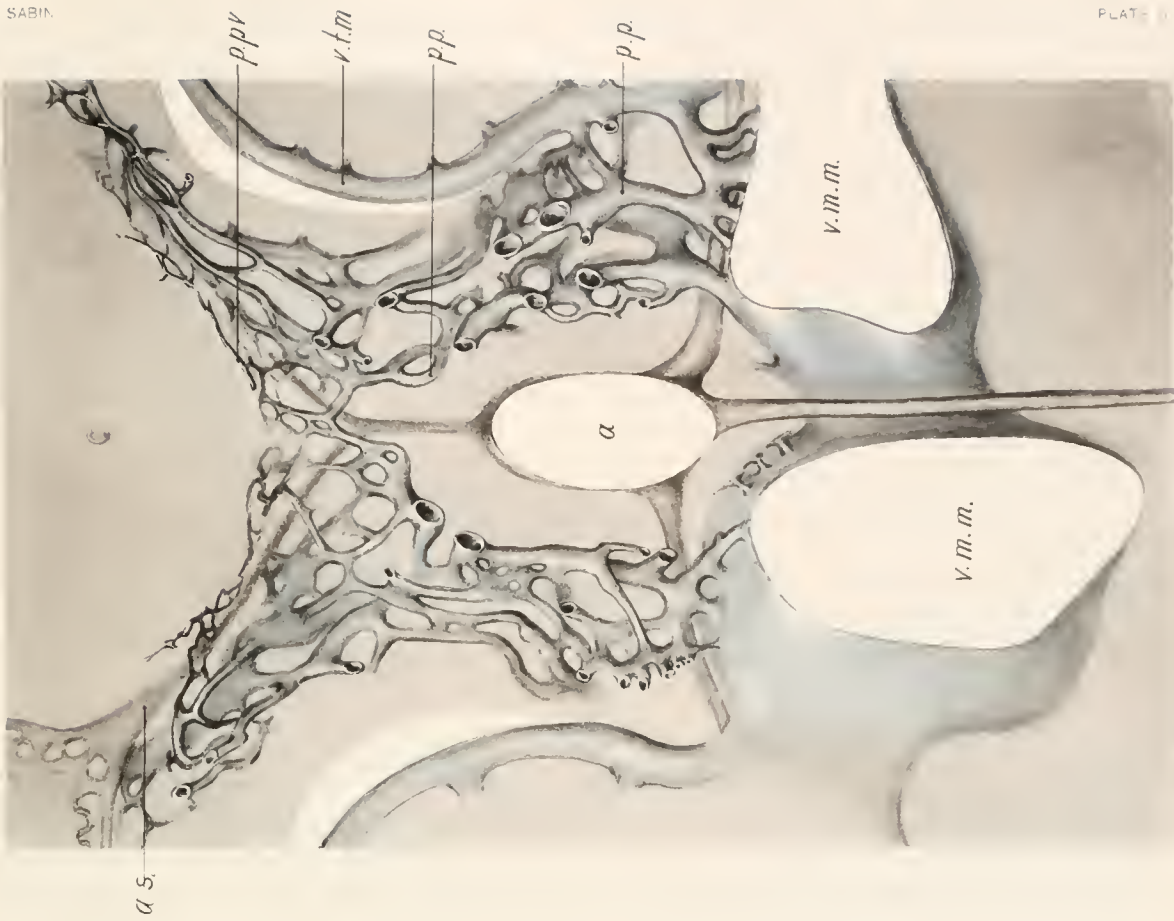
9



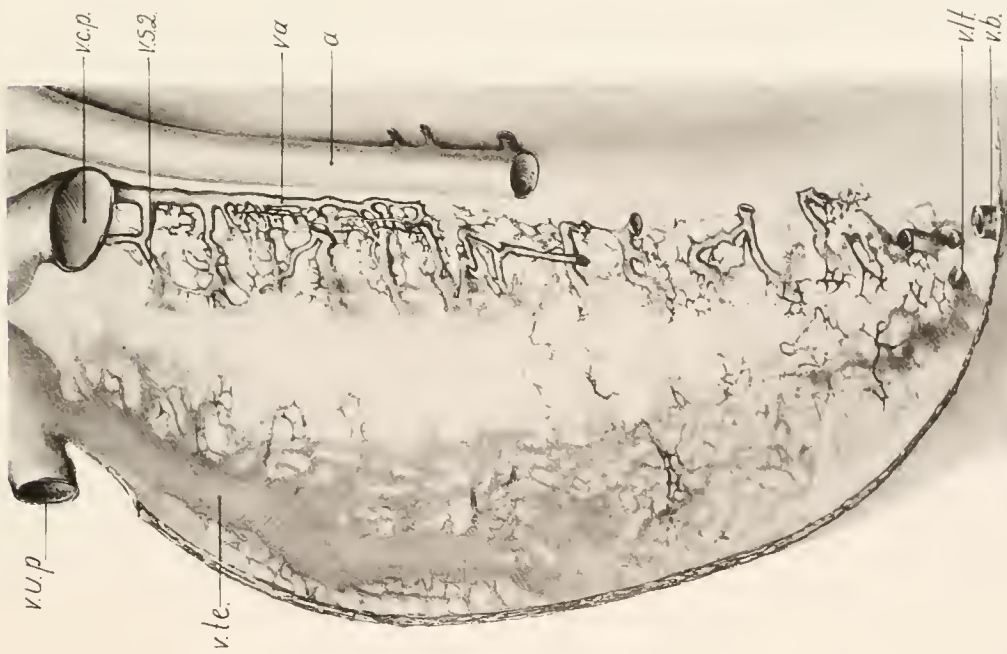
10

Fig. 9 Dissection of an injected embryo pig 16 mm. long, to show the relation of the hemiazygos vein to the cardinal veins.

Fig. 10. Section of an injected embryo pig 16 mm. long, to show the azygos veins.

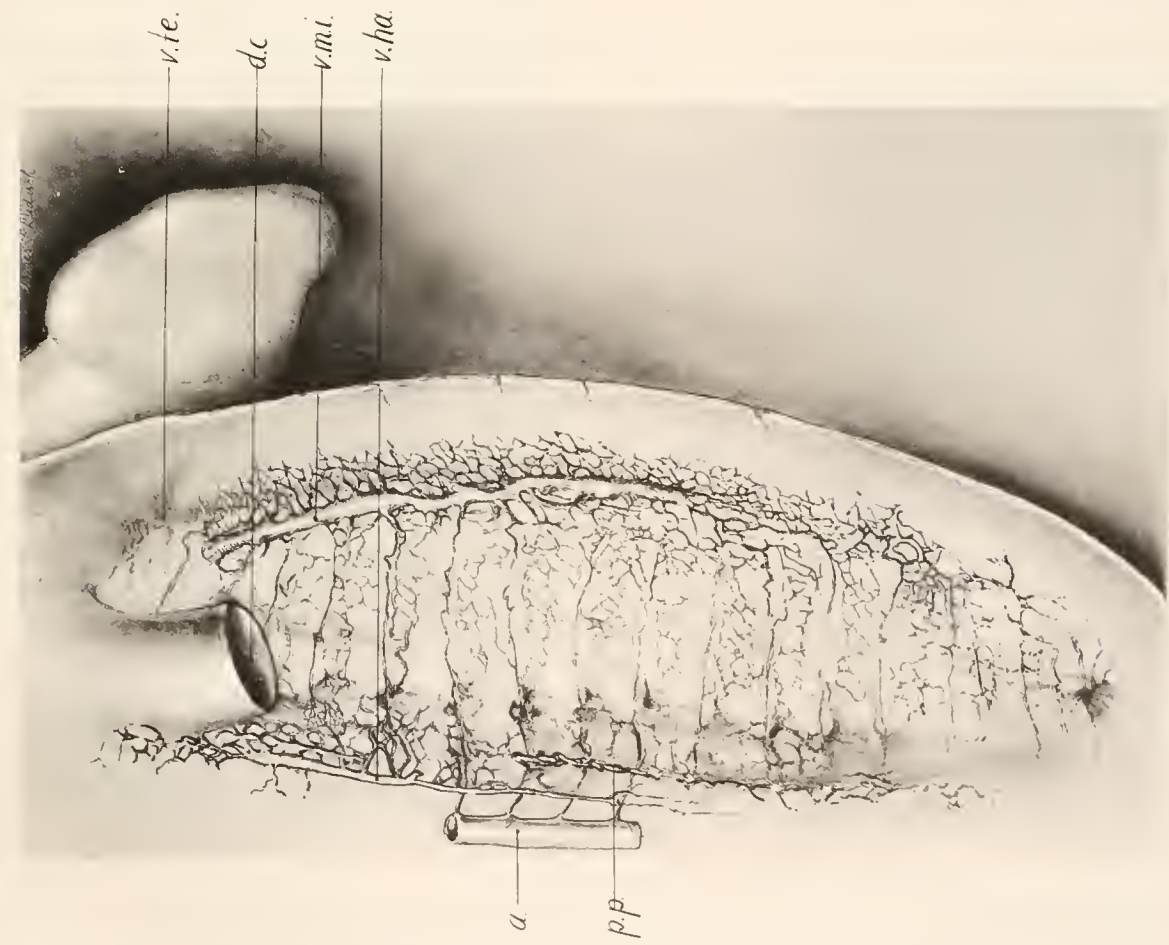


12

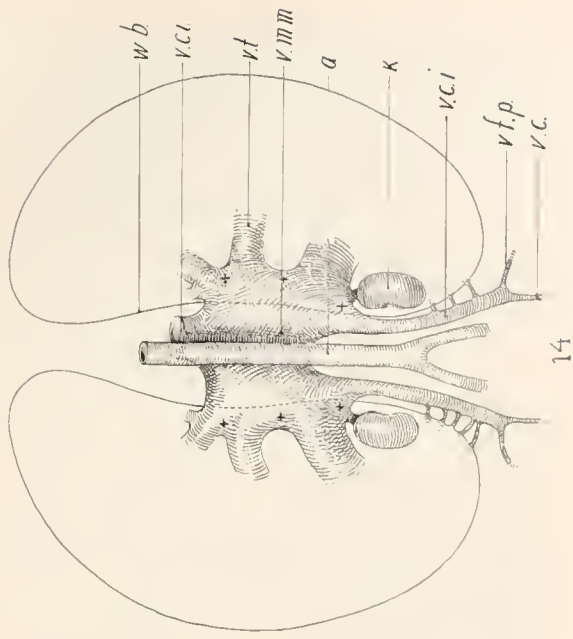


11

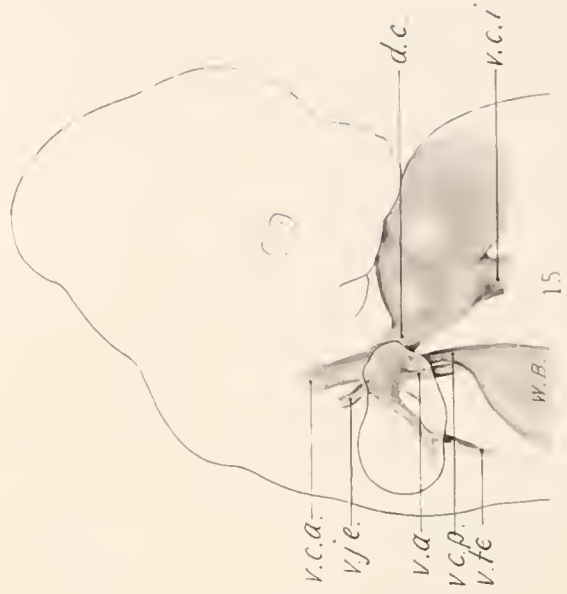
Fig. 11. Dissection of an injected embryo pig 20 mm. long, to show the azygos vein.
 Fig. 12. Section of an embryo pig 20 mm. long, to show the prevertebral plexus.



13



14



15

Fig. 13. Dissection of an injected embryo pig 17 mm. long, to show the hemiazygos vein.
Fig. 14. Diagram of the relations of the vena cava to the transverse veins of the Wolffian body from an embryo 2.4 mm. long.
Fig. 15. Dissection of an injected embryo pig 20 mm. long, to show the azygos and the posterior cardinal vein together.

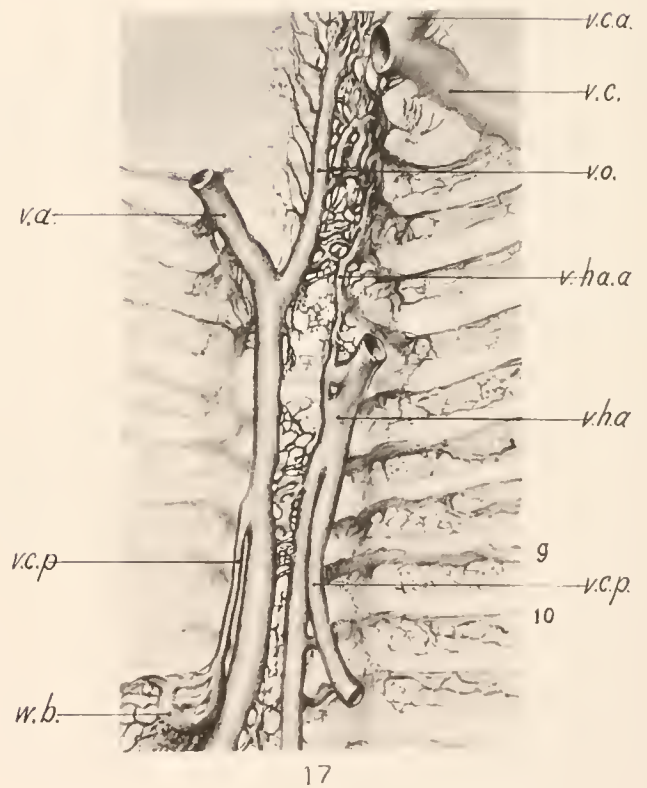
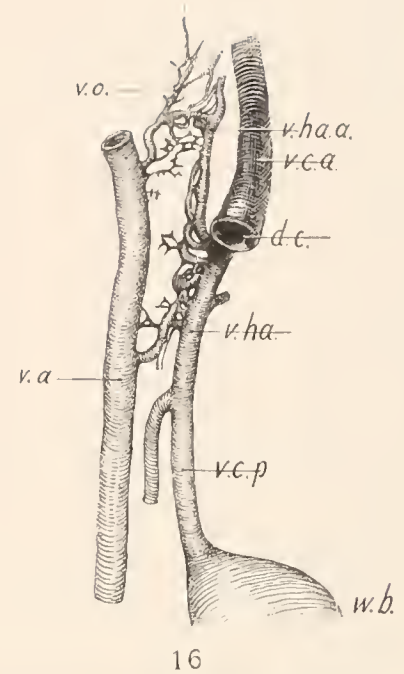
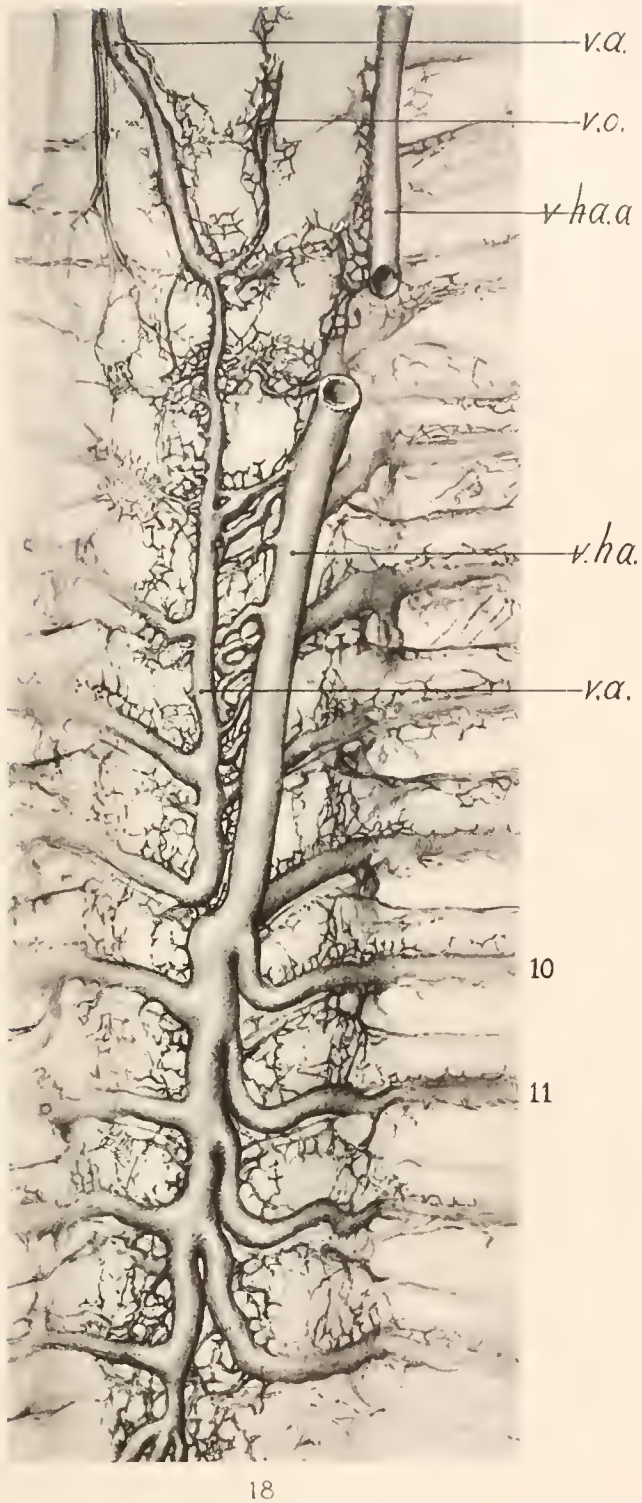


Fig. 16. Injection of the veins in an embryo pig 28 mm. long, to show the relation of the accessory hemiazygos vein to the anterior cardinal vein.

Fig. 17. Dissection of an embryo pig 28 mm. long, to show the prevertebral veins.

Fig. 18. Dissection of an embryo pig 40 mm. long, to show the prevertebral veins.

CONTRIBUTIONS TO EMBRYOLOGY, No. 8.

RECHERCHES CYTOLOGIQUES SUR LA FÉCONDATION DES
ASCIDIENS ET SUR LEUR DÉVELOPPEMENT

PAR J. DUESBERG

3 planches, 12 figures

TABLE DES MATIÈRES.

Introduction.....	35
Matériel et Technique.....	35
I. Partie descriptive.....	37
Fécondation.....	37
Spermatogenèse.....	37
Structure de l'œuf.....	41
Maturation.....	45
Fécondation.....	46
Segmentation.....	51
Données bibliographiques relatives à la segmentation des Ascidiens.....	51
Observations personnelles.....	55
Données bibliographiques relatives à la répartition des chondriosomes pendant la segmentation.....	60
Mes observations comparées à celles de Conklin.....	60
II. Partie théorique.....	62
Chondriosomes et structure du protoplasme.....	62
Chondriosomes et idioplasme.....	64
Chondriosomes et "substances organogènes".....	66
Index Bibliographique.....	68
Explication des planches.....	70

RECHERCHES CYTOLOGIQUES SUR LA FECONDATION DES ASCIDIENS ET SUR LEUR DÉVELOPPEMENT

PAR J. DUESBERG

INTRODUCTION.

Les observations que je publie dans ce travail ont été faites sur du matériel que j'ai recueilli à Naples au printemps 1912. J'ai publié en Mai 1913 une note préliminaire, donnant les résultats principaux de mes recherches cytologiques sur le développement des Ascidiens. La publication de mon travail définitif, y compris mes recherches sur la fécondation, a été retardée, d'abord par l'élaboration de l'article critique sur l'appareil réticulaire et le trophosponge, que j'avais été chargé de faire au Congrès de l'Anatomische Gesellschaft, à Innsbruck (1914), ensuite, par l'horrible guerre qui dévaste en ce moment la Belgique. Si j'ai pu enfin terminer ce travail, c'est grâce à la bienveillante hospitalité que Monsieur le Professeur Mall a bien voulu m'accorder à l'Institut d'Anatomie de la Johns Hopkins University, et grâce à l'appui de l'Institut Carnegie. Je suis heureux d'avoir l'occasion de leur exprimer publiquement ma reconnaissance.

En allant à Naples, j'avais pour but principal de recueillir des matériaux pour l'étude de la fécondation, et plus spécialement du sort du chondriome¹ du spermatozoïde dans l'œuf fécondé. Comme je recueillais à cet effet des œufs de *Ciona intestinalis*, il me vint à l'idée d'en faire aussi des cultures et de fixer les différents stades du développement: idée justifiée par les curieux résultats obtenus par Conklin (1905, 1), dans ses recherches sur les "organ-forming substances" chez une espèce voisine, *Cynthia partita*.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

L'objet de ces recherches est exclusivement *Ciona intestinalis* L. Mes observations ont porté sur l'œuf arrivé à la fin de la période d'accroissement et détaché de l'ovaire: l'œuf ovarien n'a donc pas été étudié. De plus, pour des raisons qui seront exposées plus loin, j'ai été amené à faire l'étude de la spermatogenèse.

Des fragments de *testicule*, y compris la paroi du tube digestif avec laquelle cet organe fait corps, furent fixés par les liquides d'Altmann, de Benda et par le sublimé acétique à 5 pour cent. Les morceaux fixés par le liquide de Benda furent colorés par la méthode indiquée, d'après cet auteur, par Meves et Duesberg (1908), ceux fixés par le liquide d'Altmann furent colorés par la fuchsine acide et l'acide picrique. Après le sublimé acétique, j'ai employé toute une série de colorants, notamment l'hématoxyline ferrique, l'hématoxyline acide et l'éosine, la safranine, le vert de méthyle, etc.

Le *sperme mûr* fut étudié, soit *in vivo*, soit sur des frottis fixés par les vapeurs d'acide osmique ou le liquide d'Altmann et colorés respectivement par l'hématoxyline ferrique et la méthode d'Altmann.

Les *œufs* étaient d'abord recueillis dans un cristallisateur, puis mêlés, dans de l'eau de mer fraîche, à du sperme provenant de plusieurs mâles. La plupart des auteurs, Castle (1896), Guthertz (1904), Conklin (1905, 1), etc., sont en effet d'avis que la fécondation ne se produit pas entre sperme et œufs d'un même animal. Des portions de ces œufs étaient

¹J'ai décidé d'abandonner le terme "plastosomes" et ses dérivés pour plusieurs raisons, et spécialement pour éviter toute confusion avec les "plasmosomes" d'Arnold. D'autre part, je pense qu'il est indispensable de désigner les différentes formes par des expressions différentes. J'emploierai donc, comme autrefois, "mitochondries" pour des granulations, "chondriocentes" pour des filaments, "chondriosomes" pour tous ces éléments, sans préjudice de leur forme, et "chondriome" pour l'ensemble des chondriosomes contenus dans une cellule.

ensuite fixées à des moments différents, depuis 2 minutes après l'addition du sperme jusqu'au moment de l'éclosion de la larve. J'ai constaté que la première segmentation se produit 60 à 65 minutes après l'addition du sperme et que la larve est complètement formée en 15 à 19 heures. Ces chiffres sont sensiblement plus élevés que ceux donnés par Conklin (1905, 1), ce qui peut s'expliquer par des conditions différentes de température: de fait, à Naples, le printemps de 1912, et surtout le mois d'Avril furent loin d'être chauds.

Pour être certain de ne recueillir que du matériel normal, j'ai toujours observé les premières segmentations et je n'ai conservé que les œufs dans lesquels ces phénomènes se produisaient dans les délais habituels et simultanément dans la plupart d'entr'eux. Des portions qui devaient être fixées pendant la première heure et par conséquent avant l'apparition du premier sillon, j'ai constamment isolé des œufs témoins, dont j'observais la segmentation: si celle-ci était anormale, la portion fixée était rejetée. J'ai fixé environ 120 portions.

Les liquides employés furent ceux de Benda, d'Altmann, de Flemming, de Regaud et le sublimé acétique.

Les œufs fixés par le liquide de Regaud et par le sublimé acétique furent colorés, les premiers par l'hématoxyline ferrique, les seconds par ce même colorant, par l'hématoxyline acide, par la safranine et par le vert de méthyle. Les résultats obtenus furent des moins satisfaisants. J'espérais par le premier liquide conserver les chondriosomes; par le second, les figures achromatiques. Or, j'ai constaté que, dans l'un comme dans l'autre cas, la structure de l'œuf était complètement altérée, les grains de vitellus eux-mêmes étant à peine reconnaissables.

De très nombreuses portions, formant une série complète, furent fixées par le liquide d'Altmann. Mais, quand il s'agit de colorer ces œufs, la plupart se montrèrent réfractaires. Même le mordantage par la méthode de Pal, recommandé par Rubaschkin (1910), ne donna pas de résultats. Je ne sais à quelle cause attribuer cet échec, d'autant plus regrettable que cette série était la seule complète, si ce n'est peut-être à un séjour trop prolongé des objets dans l'alcool: ce séjour n'a pourtant pour aucune portion dépassé trois mois.

J'avais heureusement fixé un certain nombre d'œufs et d'embryons par la méthode de Benda, et ce sont surtout ces œufs qui m'ont donné des résultats intéressants. Là aussi, cependant, j'ai éprouvé certaines déconvenues. Mes premiers essais de coloration ne donnèrent absolument rien. Ce n'est qu'après avoir fait repasser les œufs par les alcools de concentration décroissante et l'eau, pour les amener successivement dans le mélange d'acide pyroligneux et d'acide chromique, puis dans le bichromate de potasse, suivant la prescription de Benda, que j'ai pu obtenir des colorations, et cette fois d'excellentes. Cette observation montre que, contrairement à ce que je pensais autrefois (1910), ce traitement peut dans certains cas être utile ou même indispensable.

Les portions traitées par le liquide de Flemming étaient toutes bien fixées. La coloration par l'hématoxyline ferrique m'a donné dans certains œufs une bonne coloration des chondriosomes. Un certain nombre furent colorés par la safranine et l'acide pierique, ou par la triple coloration de Flemming. Les chondriosomes ne sont alors pas colorés; la zone où ils sont accumulés reste cependant reconnaissable. Ces préparations me rendirent des services dans l'étude de la chromatine de l'œuf et du spermatozoïde.

Pour l'enchâssement des œufs, je me suis servi avec succès des tubes en gélatine recommandés par Meves (1911).

Les coupes furent faites en séries, à 4, 5, et $7\mu\frac{1}{2}$. Pour les préparations destinées à être colorées par les méthodes de Benda ou d'Altmann, l'épaisseur des coupes n'a jamais dépassé 5μ ; elle fut le plus souvent de 4μ .

I. PARTIE DESCRIPTIVE.

FÉCONDATION.

L'étude de la fécondation nécessite une connaissance parfaite de la valeur des différents éléments du spermatozoïde. Or, la forme du spermatozoïde de *Ciona* est atypique. De plus, les observations des différents auteurs ne sont pas concordantes. Enfin, des observations personnelles m'amenèrent à douter de l'exactitude de l'interprétation de Retzius (1904), le dernier auteur qui se soit occupé du spermatozoïde de *Ciona*. Ces considérations m'ont amené à faire l'étude de la spermatogenèse, par l'exposé de laquelle je vais commencer.

SPERMATOGENÈSE.

Je me hâte de dire que cette étude est incomplète. Une étude complète, aussi minutieuse que celles que nous possédons, depuis les travaux de Meves, sur la spermatogenèse de certains autres animaux, serait extrêmement difficile, peut-être même impossible, tant les cellules sont petites: pour s'en convaincre, il suffira de jeter un coup d'œil sur les figures 1 à 6 de ce travail, dessinées sous l'objectif 1, 5 et l'oculaire 18, c'est-à-dire sous le plus fort grossissement possible. Mon but était uniquement d'arriver à déterminer quelle partie du spermatozoïde est formée par les chondriosomes.

Il n'existe à ma connaissance aucune observation sur la spermiogenèse de *Ciona*.

Les frères Zoja (1891) mentionnent que, dans le testicule traité par la méthode d'Altman, "nel piccolo corpo cellulare dell' epitelio dei tubuli sono plastiduli tondeggianti, abbastanza numerosi, disposti a corona attorno al nucleo."

Ballowitz (1894) et Retzius (1904) ont étudié le spermatozoïde mûr.

D'après Ballowitz, la tête du spermatozoïde est très petite. Vue de face, elle a la forme d'un ellipsoïde allongé, "und zeigt bei gewisser Einstellung einen hellen dellenartigen Fleck, der an die Delle der roten Blutkörperchen erinnert." Une vue latérale montre qu'effectivement la tête a une forme recourbée, de croissant ou de virgule. L'extrémité antérieure se termine par un court "Spitzenstück." A l'extrémité postérieure, Ballowitz dessine une granulation, qui est vraisemblablement de nature centriolaire.

La queue du spermatozoïde se compose, d'après Ballowitz, de deux parties, dont la terminale est plus grêle que l'autre.

La description de Retzius diffère de celle de Ballowitz sur un point important. Sur la forme générale du spermatozoïde, les deux auteurs sont d'accord, mais Retzius constate de plus que la concavité de la tête est occupée par un corps de forme sphérique, dont l'existence paraît avoir échappé à Ballowitz, bien qu'il en dessine le contour dans la figure 9 de son travail. Ce corps occupe le plus souvent la partie moyenne de la tête; il peut être aussi reporté en avant ou en arrière. Tandis que la partie en forme de croissant représente pour Retzius le noyau du spermatozoïde, ce corps, fortement colorable par la rosaniline, correspond au "Nebenkernorgan," c'est-à-dire au chondriome.

Retzius a trouvé aussi des spermatozoïdes dont la tête est régulièrement arrondie et pourvue latéralement du même corps: ce sont peut-être des stades jeunes.

Les spermatozoïdes d'autres espèces de Tuniciers ont été étudiés par Pictet (1891), par Julin (1893), par Ballowitz (1894), par Retzius (1904) et par Meves (1913). Seules les observations de Retzius et de Meves nous intéressent.

Retzius décrit le spermatozoïde de *Clavellina lepadiformis*: il ne diffère de celui de *Ciona* que par des détails sans importance au point de vue qui nous occupe.

Chez *Phallusia mamillata* (et aussi chez une autre espèce, probablement *Phallusia aspersa*), Meves a trouvé une disposition assez différente, tout au moins en ce qui concerne la tête. C'est un bâtonnet très mince, effilé aux deux extrémités. Sa partie moyenne se colore vivement en rouge dans les préparations traitées par l'acide osmique et la méthode d'Altmann, et aussi dans celles traitées par le sublimé et la méthode d'Ehrlich-Biondi. Cette coloration est due à la présence d'une gaine tubulaire de substance mitochondriale.

Dans certains spermatozoïdes, Meves trouve, à la place de la gaine tubulaire, un filament spiral. Il est tenté de croire que la gaine tubulaire dérive de ce dernier, probablement par suite de la confluence des tours de spire.

Enfin, d'autres spermatozoïdes présentent l'aspect suivant: La substance mitochondriale a la forme d'un bâtonnet, ou d'une boule, placé latéralement par rapport à la tête. Celle-ci peut être recourbée en virgule. On a alors une forme analogue à celle du spermatozoïde de *Ciona*. N'ayant pas étudié la spermiogenèse, Meves hésite à trancher la question de savoir s'il s'agit là de formes normales de l'évolution du spermatozoïde ou d'altérations dues aux réactifs. Ces formes n'interviennent en tous cas pas dans la fécondation. Meves compare cette disposition de la substance mitochondriale à celle décrite par Retzius chez *Ciona*: nous verrons tout-à-l'heure que mon interprétation du spermatozoïde de cette dernière espèce est toute différente de celle de Retzius et que par conséquent ce rapprochement ne peut être maintenu.

En comparant les images que Retzius donne des spermatozoïdes de *Ciona* et de *Clavellina*, images faites d'après des préparations traitées vraisemblablement par l'acide osmique et le violet de gentiane ou la rosaniline (cf. l'explication des figures dans Retzius), j'ai été frappé par le fait suivant: Chez *Ciona*, Retzius donne au noyau une teinte claire, au "Nebenkernorgan," une teinte foncée; l'inverse chez *Clavellina*.

De plus, en étudiant dans l'eau de mer le spermatozoïde vivant de *Ciona*, je constatai que le corps arrondi se distingue à peine du milieu ambiant: ce qui concorde avec l'observation de Retzius, qui dit que ce corps est "im ungefärbten Zustande ganz hell und durchsichtig." Par contre, la partie en forme de virgule, plus réfringente, est nettement visible. Or, j'ai pu, en même temps que je faisais ces observations sur le spermatozoïde de *Ciona*, en faire d'autres sur des spermatozoïdes de forme plus typique, notamment sur celui de *Cerebratulus*, et constater chez cette espèce que les grosses mitochondries qui occupent l'extrémité postérieure de la tête présentent les mêmes caractères.

Ces raisons me détournèrent d'accepter sans contrôle l'interprétation de Retzius.

Des frottis de spermatozoïdes, prélevés dans le canal déférent, me donnèrent les images suivantes:

Ceux traités par les vapeurs d'acide osmique et l'hématoxyline ferrique me montrèrent le corps recourbé fortement coloré en noir, tandis que le "Nebenkernorgan" de Retzius était faiblement teinté.

Une coloration beaucoup plus caractéristique fut obtenue en traitant des frottis par les vapeurs d'acide osmique ou par le liquide d'Altmann, puis par la fuchsine acide et l'acide picrique. Le corps concave garde la fuchsine jusqu'à décoloration du corps arrondi.

On est tenté d'en conclure en faveur de la nature mitochondriale du corps recourbé, que Retzius considère comme le noyau. Cette conclusion est encore appuyée par la coloration des spermatozoïdes que l'on trouve entre les œufs: d'une manière absolument constante, le corps en question est, dans les préparations faites par la méthode de Benda, fortement coloré en violet; dans celles faites par la méthode d'Altmann, fortement coloré en rouge. Dans

ces mêmes préparations, le corps arrondi est coloré respectivement en brun ou en jaune: l'intensité de ces colorations est faible.

Mais, ce qui complique les choses, c'est que Ballowitz, en traitant des frottis de spermatozoïdes par l'acide osmique et le violet de gentiane, a coloré vivement le corps concave, tandis que le corps arrondi paraît, comme nous l'avons vu tout-à-l'heure, lui avoir complètement échappé.

Il ne me restait d'autre ressource, pour trancher la question, que de faire l'étude de la spermiogénèse.

Le premier stade que je vais décrire est représenté dans la figure 1 de ce travail. Il s'agit de cellules relativement volumineuses, formant une assise régulière tout contre la membrane anhiste qui délimite le tube séminal. Ces cellules ont un gros noyau, dans lequel la chromatine est ramassée en deux ou trois granulations. Dans le protoplasme, les méthodes de Benda ou d'Altmann mettent en évidence des éléments qui ne sont pas, ou sont mal conservés dans les préparations au sublimé acétique et qui sont bien certainement les chondriosomes de ces cellules. Ce sont des bâtonnets gros et courts, peut-être aussi des grains (ceux-ci sont cependant le plus souvent la coupe de bâtonnets), qui peuvent être répandus dans toute la cellule, mais s'accumulent généralement d'une manière plus ou moins nette à un pôle du noyau: disposition qui rappelle la description des frères Zoja (voir plus haut). D'après la situation de ces cellules et leurs caractères, je crois pouvoir les considérer comme des spermatogonies.

La figure 2 représente une autre espèce de cellules. Celles-ci sont habituellement situées en dedans des précédentes et forment des groupes assez nombreux. La chromatine de leur noyau est disposée d'une manière caractéristique. Ce sont certainement des spermatocytes de premier ordre. Chacune de ces cellules ne renferme habituellement qu'un ou deux chondriocones: bâtonnets longs, épais et renflés aux extrémités, qui s'étendent du champ polaire au pôle opposé de la cellule, en décrivant une courbe autour du noyau. Comme le montre la figure 2, on observe, et très souvent, que ces bâtonnets sont formés d'une substance corticale fortement colorée et d'une substance médullaire plus claire.

Sur la manière dont les chondriosomes se comportent pendant les divisions de maturation, je ne puis fournir de données précises. Une chose pourtant est certaine: toutes les cellules-filles reçoivent des chondriosomes.

La figure 3 représente une spermatide jeune. En comparant cette figure à la précédente, on pourra juger de la considérable réduction de volume que subissent les cellules séminales pendant la période de maturation. Par la méthode employée, le noyau paraît homogène; sa coloration est très faible. Chacune de ces cellules renferme, en outre, coiffant un pôle du noyau, un chondriosome relativement volumineux en forme de disque. Ici aussi, on distingue une substance corticale fortement colorée et le plus souvent, peut-être toujours, interrompue en un point, et une substance médullaire plus claire. On peut aisément se figurer comment un tel corps a pu se former aux dépens de l'un des bâtonnets du spermatocyte de premier ordre.

A un stade ultérieur, représenté figure 4, nous voyons que chondriosome et noyau ont modifié leur forme, de façon à s'appliquer l'un contre l'autre par une face aplatie. On constate de plus que dans le chondriosome, les substances corticale et médullaire ne sont plus aussi complètement séparées, mais paraissent en train de se mélanger.

La figure 5 nous fait faire un pas considérable vers la fin du processus. Nous voyons que maintenant le chondriosome a pris une forme recourbée, se rapprochant déjà beaucoup de celle du corps que Retzius considère comme le noyau du spermatozoïde. Pas plus qu'au

stade précédent, sa structure n'est homogène. Dans sa concavité se trouve logé le noyau, sous forme d'une vésicule très faiblement colorée.

Enfin, dans la figure 6, nous avons sous les yeux un spermatozoïde choisi au milieu d'un groupe de ces éléments déjà libres dans le conduit excréteur. Le chondriosome a la forme d'un bâtonnet fortement recourbé et de structure parfaitement homogène. Son épaisseur est moins considérable qu'au stade précédent et sa coloration est plus vive: il s'est certainement produit une forte condensation de sa substance. Ce bâtonnet reçoit dans sa concavité le noyau, toujours très faiblement coloré.¹

A la suite de ces observations, il ne peut à mon avis y avoir aucun doute: des deux éléments qui constituent la partie antérieure du spermatozoïde de *Ciona*, le corps recourbé est le corps mitochondrial, l'autre est le noyau. Cette conclusion est diamétralement opposée à celle de Retzius.

Quelle que soit cependant la valeur des résultats obtenus par l'emploi des méthodes de coloration des chondriosomes, il était désirable de chercher une explication des résultats de Ballowitz. A défaut de frottis traités par le violet de gentiane, des préparations fixées par le sublimé acétique et colorées par l'hématoxyline acide et d'autres colorants nucléaires me permirent de résoudre cette difficulté.

On retrouve aisément dans ces préparations les spermatogonies, les spermatocytes de premier ordre et les spermatides. En ce qui concerne ces dernières, on constate que, conformément aux résultats obtenus par la méthode de Benda, leur noyau est une vésicule faiblement colorable. Soit dit, en passant, la faible chromaticité des noyaux me paraît être une caractéristique des tissus des Ascidiens, ou tout au moins de *Ciona*.

Dans le cytoplasme des spermatogonies et des spermatocytes, fixés par le sublimé acétique, on ne trouve habituellement aucun élément figuré: parfois cependant quelques granulations dont on pourrait supposer, d'après ce qui va être dit, qu'il s'agit de fragments de chondriosomes qui n'ont pas été dissous par l'acide acétique. Ce qui est peut-être en rapport avec leur volume relativement considérable. Dans la spermatide par contre, on trouve constamment, à partir d'un certain stade de son évolution, à côté de la vésicule claire qui représente le noyau, un gros grain fortement colorable par toutes les matières colorantes. Si l'on suit l'évolution de ce grain, on constate qu'elle est identique à celle du chondriosome décrit tout-à-l'heure. Dans le spermatozoïde mûr, par conséquent, le crochet mitochondrial se teinte vivement même par les colorants nucléaires, notamment l'hématoxyline acide et la safranine, tandis que le noyau est beaucoup plus faiblement coloré. Il est probable que le violet de gentiane, employé par Ballowitz, donne les mêmes résultats.

Je conclus de ces observations que le chondriome des cellules séminales de *Ciona* subit au cours de la spermiogenèse des changements, soit dans sa composition chimique, soit simplement dans sa constitution physique: une condensation très forte de sa substance par exemple. Quoiqu'il en soit, ces modifications sont telles que ce corps résiste à l'action dissolvante de l'acide acétique et se colore vivement par n'importe quel colorant. De semblables modifications ne sont pas rares: l'étude de la spermatogenèse d'autres animaux nous en fournit de nombreux exemples. On pourra consulter à ce sujet Regaud (1910), Duesberg (1912), Cowdry (1914).

¹Telle est d'une manière constante la forme des spermatozoïdes observés dans le conduit excréteur du testicule, et aussi de ceux qui nageaient autour des œufs et qui ont été fixés en même temps que ceux-ci. Il ne peut par conséquent y avoir de doute: la figure 6 représente bien un spermatozoïde mûr.

De la description que j'ai donnée du spermatozoïde de *Ciona*, il résulte que le chondriome de ce spermatozoïde doit fatalement être introduit dans l'œuf au moment de la fécondation.¹ Mon intention est précisément de rechercher le sort de cet élément dans l'œuf fécondé. Mais auparavant, il nous faut étudier la structure de l'œuf.

STRUCTURE DE L'ŒUF.

On sait que l'œuf des Ascidiens est entouré de deux couches de cellules, la couche des cellules folliculeuses (Schauhzellen) et la couche des cellules du testa, séparées par une membrane anhiste ou chorion.

Des très nombreuses observations relatives à la structure de l'œuf et de ses enveloppes, les suivantes me paraissent plus spécialement en rapport avec mon sujet.

Les frères Zoja ont traité l'œuf de *Ciona* par la méthode d'Altmann:

Nelle uova piccole i plastiduli, rotondi, piuttosto piccoli, di varia misura, sono raccolti presso il nucleo, spesso anche accumulati ad una parte della cellula, come una semiluna. Il resto della cellula uovo è allora riempito di tenuissimi plastiduli, che nell'insieme danno una tinta rossa al protoplasma e sono visibili solo usando di forti ingrandimenti.

Les frères Zoja signalent à cet endroit la disposition périnucléaire des chondriosomes dans les jeunes ovocytes, reconnue depuis si fréquente (voir à ce sujet Duesberg, 1912). Ils continuent:

Nelle uova più grandi le cellule del follicolo hanno dapprima plastiduli piccoli, rotondi, sparsi, non abbondanti, e alcune vesicole chiare; ingrandendosi queste la cellula è occupata quasi totalmente da vesiccollette, fra le quali stanno i plastiduli più abbondanti presso il nucleo. Le cellule dell'epitelio testaceo sono nelle loro prime fasi riempite di fini plastiduli rotondi, stipati attorno al nucleo; fra essi sono forme anulari verde-bruno. Queste pare diano origine a sferette verde-cupo, le quali poi si fanno più chiare e confluiscono formando sfere più grandi, nelle quali sono riconoscibili le forme minori. Attorno ad uova più grosse, dove i confini dell'epitelio testaceo sono assai meno visibili, le sferette verdi pare siano disciolte in parte in lacune chiare. Nel vitello, internamente alla zona di queste sfere e lacune dovuta alla dissoluzione dell'epitelio testaceo, sono numerosi plastiduli tondeggianti, piuttosto piccoli, che, ammassati prevalentemente ad un lato e alla periferia, giungono fino al nucleo; la parte centrale è occupata dalle sfere vitelline.

Bluntsehli (1904) et surtout Mlle. Loyez (1909), puis Schaxel (1911) ont également publié des observations sur les chondriosomes de l'ovocyte des Ascidiens, sur lesquelles il me paraît inutile d'insister.

Les recherches de Castle (1896), de Conklin (1905, 1), de Retzius (1911, 2) et de Meves (1913) sur la structure de l'œuf mûr méritent par contre de nous arrêter plus longuement.

Castle signale l'existence à un pôle de l'œuf, d'une accumulation de protoplasme granuleux, pauvre en vitellus.

Les observations de Conklin sont beaucoup plus détaillées.

L'œuf examiné à la fin de la période d'accroissement présente à considérer une couche périphérique granuleuse, une couche centrale riche en vitellus et la vésicule germinative placée excentriquement. Chez *Ciona*, la couche périphérique est transparente et légèrement épaissie au pôle opposé à la vésicule germinative, c'est-à-dire au pôle végétatif. Chez *Cynthia*, cette zone présente une égale épaisseur dans toute son étendue et possède de plus la remarquable propriété suivante: les granulations qu'elle renferme sont associées à un pigment jaune, soluble dans l'alcool, grâce auquel cette zone est facilement reconnaissable *in vivo*.

¹La description donnée par Retzius autorisait d'ailleurs la même conclusion.

Quand la membrane de la vésicule germinative se rompt, le nucléoplasme s'accumule au pôle animal. L'œuf vivant de *Cynthia* présente alors trois zones nettement reconnaissables à leur coloration différente: une zone périphérique de coloration jaune, une zone centrale, chargée de vitellus, de coloration gris foncé et une zone claire occupant le pôle animal. L'étude de l'œuf de *Ciona* permet de lui reconnaître une structure analogue.

Au moment où le spermatozoïde pénètre dans l'œuf, ces différentes substances sont le siège de mouvements, de courants, qui sont particulièrement faciles à observer chez *Cynthia*. Le protoplasme jaune et le protoplasme clair s'accumulent au pôle végétatif. Le protoplasme jaune forme une calotte entourant tout l'hémisphère végétatif et renfermant le noyau mâle, qui pénètre toujours à ce niveau. Le protoplasme clair se trouve placé plus profondément que cette calotte. Le protoplasme gris foncé, c'est-à-dire le vitellus, occupe le restant de l'œuf: il entoure par conséquent, au niveau du pôle animal, les figures de maturation. Quand un peu plus tard le noyau mâle se déplace (voir plus loin), il entraîne avec lui une partie du plasmе jaune. Cette accumulation forme le "crescent" de Conklin. Elle est placée juste sous l'équateur de l'œuf.¹

Ces recherches établissent l'existence dans l'œuf des Ascidiens d'une polarité remarquable, due à la localisation régulière de certaines substances. Nous verrons plus loin les rapports importants qui existent entre cette localisation et le développement de l'embryon. De cette structure, on ne trouve aucune mention, ni dans Boveri (1890), ni dans Golski (1899). Elle a par contre été entrevue par Retzius (1911, 2). Cet auteur représente planche 15, figure 13, un œuf de *Ciona* pris dans le canal excréteur, et signale "eine feinkörnig erscheinende Schicht, welche sich besonders an einem Teil des Eies angesammelt . . . hat." Il s'agit évidemment ici de la couche granuleuse de Castle et de Conklin.

Meves (1913) constate, après Conklin (1911), que chez *Phallusia mamillata*, l'œuf présente aussi une polarité très nette. Ses recherches, faites à l'aide de la méthode d'Altmann, nous en donne l'explication suivante: L'œuf est constitué par de la "Grundmasse," des grains vitellins et des chondriosomes de forme granuleuse, annulaire ou légèrement allongée. Ces derniers éléments sont répartis dans tout l'œuf, entre les grains vitellins, et sont plus nombreux au pôle végétatif. Ils forment là une couche importante, qui apparaît sur les coupes comme un croissant. La surface externe de cette couche n'est pas régulière, mais fortement découpée; elle est séparée de la surface de l'œuf par une couche de Grundmasse, ne renfermant ni mitochondries, ni grains vitellins.

Cette couche correspond évidemment au croissant de Conklin. Celui-ci représente par conséquent une accumulation de mitochondries. Quant au "clear protoplasm" qui, dès le début de la fécondation, forme d'après Conklin une zone moyenne au voisinage du croissant, Meves en nie l'existence. Une zone claire, dépourvue de vitellus, apparaît à la

¹Résumant dans un travail ultérieur (1905, 3) ses observations sur le développement, Conklin dit que dans l'œuf non segmenté de *Cynthia*—

"At least five distinct kinds of ooplasm can be recognized. These are (1) the deep yellow protoplasm which later enters into the muscle cells of the tail of the larva; (2) the light yellow material which becomes mesenchyme; (3) the light gray material which forms the chorda and neural plate; (4) the slate gray substance which becomes endoderm, and (5) the clear transparent protoplasm which gives rise to the general ectoderm. All of these substances are recognizable in the egg before the first cleavage, and immediately after that cleavage they all occupy their definitive positions in the egg, the yellow protoplasm forming a yellow crescent around the posterior side of the egg just dorsal to the equator, the light gray substance forming a gray crescent around the anterior border of the egg, the slate gray substance lying at the middle of the dorsal hemisphere and between the two crescents, while the transparent protoplasm is chiefly localized in the ventral hemisphere of the egg."

Je reviendrai plus loin sur la structure de l'œuf au moment de la première segmentation, mais je dois faire remarquer dès maintenant que ce résumé n'est pas tout-à-fait exact. D'après le texte même que je viens de citer, l'œuf de *Cynthia* ne renferme que 4 plasmes, le jaune, le clair, le gris foncé et le gris clair. Ce dernier n'est pas signalé par Conklin chez *Ciona* (il ne le signale chez *Cynthia* qu'en 1905, 2), ni chez *Phallusia* (1911). Comme de plus Conklin à diverses reprises ne mentionne dans ses travaux que trois substances principales, je suivrai son exemple.

vérité après trois quarts d'heure autour des pronuclei: mais cette zone n'est que l'extension du "helles Hof" qui entoure la tête du spermatozoïde. Elle ne dérive donc pas, comme le pense Conklin, du suc de la vésicule germinative.

Passons maintenant à l'exposé de mes propres observations, qui n'ont porté, je le répète, que sur des œufs détachés de l'ovaire.

En ce qui concerne les *cellules folliculeuses*, j'ai remarqué que ces cellules se dissolvent dans certains réactifs. Cela explique que Retzius ne les a pas vues: il déclare, à propos des observations qui ont été rapportées plus haut, que ces cellules auraient été "abgeworfen." Parmi les réactifs que j'ai employés, seul le liquide d'Altmann (et parfois le liquide de Flemming) les conserve. Les œufs fixés par ce liquide sont tous entourés d'une couronne de ces cellules (figure A). Elles sont très longues et insérées par une base élargie sur le chorion de l'œuf. Le noyau est reporté à l'extrémité distale. Le protoplasme est réduit à de minces lamelles, limitant des vacuoles. C'est dans ces lamelles que devraient se trouver les chondriosomes, si ces cellules en renferment. Mes préparations à la méthode d'Altmann laissant beaucoup à désirer, je n'ai pu me former d'opinion sur ce point, mais je n'ai aucune raison de douter de l'exactitude de la description des frères Zoja.

Dans les *cellules du testa* par contre, j'ai pu me convaincre de l'existence des "plastidules" décrits par les auteurs italiens. Dans l'œuf détaché de l'ovaire, ce sont des grains, ou plus souvent de petits bâtonnets, pas très nombreux, logés dans des travées protoplasmiques limitant des vacuoles à contenu clair. Ils ont une tendance à se grouper autour du noyau (figure 7).

Je trouve en outre dans ces cellules, après fixation par le liquide d'Altmann, de très nombreuses granulations d'une teinte vert-brunâtre, ressemblant à du pigment (figure A). Bien que le très grand nombre de ces granulations rende difficile la détermination exacte de leur situation, je crois pouvoir affirmer qu'elles sont situées dans les travées protoplasmiques, avec les chondriosomes. Elles ne sont donc pas un précipité de la substance contenue dans les vacuoles. Il me paraît probable que ces granulations correspondent aux "forme anulari verde-bruno," décrites par les frères Zoja.

L'*œuf* est formé d'une substance fondamentale, dans laquelle les liquides de Flemming, de Benda et d'Altmann ne montrent aucune structure, si ce n'est au niveau des figures karyokinétiques. Dans cette substance se trouvent logés des éléments figurés de deux sortes: des grains vitellins et des chondriosomes.

Les grains vitellins sont des éléments assez régulièrement sphériques, de calibre très variable. Quelques-uns se colorent en noir par l'acide osmique.

Les chondriosomes sont des granulations beaucoup plus fines.

La répartition de ces deux catégories d'éléments est absolument comparable à celle décrite par Meves chez *Phallusia* (figure 7).

Les chondriosomes sont accumulés au pôle végétatif, suivant une zone qui apparaît sur les coupes comme un croissant s'étendant jusqu'à l'équateur de l'œuf. La surface externe de cette zone est fortement découpée et est séparée de la surface de l'œuf par une mince bande de substance fondamentale ne renfermant aucun élément figuré. De la surface



FIG. A.—Cellules folliculeuses et cellules du testa. Méthode d'Altmann. Imm. 2 mm., œ. 4.

profonde du croissant partent des traînées de mitochondries qui se répandent dans tout l'œuf, entre les grains vitellins. Ceux-ci sont très rares dans le croissant mitochondrial.

Comparons maintenant ces résultats à ceux de Conklin.

Conklin admet que chez *Ciona*, la couche granuleuse est, déjà avant la fécondation, plus épaisse au pôle végétatif: la polarité de l'œuf n'est donc pas déterminée par le spermatozoïde. Je pense pour ma part, qu'il n'y a sous ce rapport aucune différence de structure entre l'œuf non fécondé et l'œuf fécondé. Il n'existe d'ailleurs pas chez *Ciona*, comme je l'ai déjà fait remarquer (p. 8, 1913), de couche granuleuse s'étendant sur toute la périphérie de l'œuf: cette couche n'existe qu'au pôle végétatif.

Dans les œufs non fécondés il existe de plus, d'après Conklin, une calotte de protoplasme clair au pôle animal. Dans mes préparations, je ne trouve rien d'analogue: les grains vitellins entourent étroitement le fuseau de maturation.

Dans les œufs fécondés, les trois plasmes de Conklin sont disposés de la manière suivante: au pôle végétatif le plasma jaune, au pôle animal le plasma gris foncé et entre ces deux une zone claire. Il s'agit de savoir si nous trouvons dans les coupes une disposition correspondant à cette dernière.

De fait, j'ai souvent constaté que dans la région immédiatement sus-jacente au croissant mitochondrial, les grains de vitellus sont moins étroitement serrés les uns contre les autres qu'au pôle animal,¹ et il est vraisemblable que dans l'œuf examiné entier, cette zone paraît plus claire que le restant de l'œuf.² On observe de plus que les grains vitellins, et entre eux les mitochondries, paraissent disposés en traînées. Je me suis efforcé de rendre cet aspect dans la figure 7; il était plus net dans l'œuf du même stade représenté dans ma note préliminaire (1913, figure 7). Sans pouvoir l'affirmer d'une manière absolue, puisque je n'ai pas étudié systématiquement l'œuf avant la fécondation, je pense que cette disposition ne s'observe que dans les œufs fécondés. Il me paraît dès lors plausible d'admettre qu'elle est en rapport avec des mouvements plasmatiques, tels que ceux décrits par Conklin.

Mais s'agit-il là, comme le pense cet auteur, de l'accumulation d'une substance spéciale d'origine nucléaire?

On pourrait évidemment invoquer en faveur de l'opinion de Conklin les expériences de Lillie (1906). Dans des œufs de *Chatopterus pergamentaceus* centrifugés avant la segmentation, Lillie voit les matériaux de l'ovoplasme se disposer en couches, dont l'une, occupant un des pôles de l'œuf, a une coloration grise. Cette calotte ne se forme cependant pas dans les œufs centrifugés avant la disparition de la vésicule germinative. Sa substance provient donc de celle-ci, et elle conserve en quelque sorte son individualité, au moins pendant un certain temps, dans l'ovoplasme.

Mais, par contre, je rappellerai que je ne trouve dans mes préparations, au niveau du fuseau de maturation, rien qui rappelle la couche de protoplasme clair de Conklin.³ Je ferai de plus remarquer que le noyau de l'œuf de *Ciona* est bien petit pour qu'une partie de sa substance forme une couche aussi importante que la couche en question. Enfin, si je comprends bien Conklin, c'est cette même substance claire qui va entourer le pronucleus mâle et, plus tard, les deux pronuclei: or, et ceci est le point essentiel, cette continuité est tout-à-fait insoutenable. La zone claire qui entoure les pronuclei et la figure de division provient de l'extension de la zone dépourvue de grains vitellins et de chondriosomes, du "helles Hof," qui entoure la tête du spermatozoïde: je suis sur ce point entièrement d'accord avec Meves.

¹D'après les figures du travail de Meves, cette disposition n'existe pas chez *Phallusia*.

²Les photographies publiées par Conklin (1905, 2) confirment cette manière de voir (cf. phot. 1 et 2).

³Il s'agit bien entendu d'œufs non fécondés.

MATURATION.

Les phénomènes de maturation ont été étudiés en dernier lieu par Golski (1899) et par Conklin (1905, 1).

D'après Golski, on trouve au milieu de l'œuf non fécondé le premier fuseau de maturation. L'émission du premier globule polaire se fait après la fécondation.

Aux pôles de ce fuseau, Golski décrit des irradiations et un "centrosome" punctiforme ou parfois allongé: c'est là le point essentiel de sa description. Les chromosomes sont de forme sphérique déjà à la métaphase. Sur les filaments fusoriaux apparaissent ensuite des renflements, qui confluent pour former un corpuseule intermédiaire.

Entre le premier et le second fuseau, la différence de forme est peu nette. Le second fuseau est plus étroitement entouré de vitellus que le premier.

Conklin trouve aussi le premier fuseau formé dans les œufs non fécondés. S'il n'est pas fécondé, l'œuf persiste à la métaphase de la première division. Les deux fuseaux ne diffèrent guère que par la taille: le second est le plus petit. Conklin diffère de Golski sur un point important: il ne trouve ni centrosomes, ni irradiations. Entre les chromosomes des deux divisions, il observe des différences de forme. Ceux de la première division, en forme de V ou d'Y à la prophase, de croix à la métaphase, sont nettement hétérotypiques. Les chromosomes de la seconde division ont la forme de petits bâtonnets.

Bien que j'aie surtout eu en vue dans ce travail l'étude des chondriosomes, j'ai fait également des observations sur la formation des globules polaires. Les voici:

Tout d'abord, j'ai constaté que les œufs ne sont pas constamment, comme le pensent Golski et Conklin, au stade de la première métaphase au moment de la fécondation. J'ai représenté dans la figure B une partie d'un œuf fécondé, fixé 5 minutes après l'addition de



FIG. B.—Œuf fécondé fixé après 5 minutes. Prophase de la première division. Méthode de Benda. 1mm. 2 mm., œ. 18.

FIG. C.—Œuf fixé après 10 minutes. Métaphase de la première division. Flemming, safranine. 1mm. 2 mm., œ. 18.

FIG. D.—Œuf fixé après 10 minutes. Anaphase de la première division. Flemming, safranine. 1mm. 2 mm., œ. 18.

sperme, dont la vésicule germinative est encore nettement limitée. Elle a cependant très probablement déjà subi une diminution de volume. A ce propos, je signale que chez *Cynthia*, Conklin représente la vésicule germinative à un stade analogue (figure 77), entourée d'une vaste zone claire. Cette zone n'existe pas chez *Ciona*, ou du moins est très peu étendue.¹ On voit d'après la figure ci-contre que les grains vitellins entourent étroitement la vésicule germinative.

Sur la forme des chromosomes, mes observations concordent avec celles de Conklin. La figure B montre des chromosomes en forme de V ou d'Y, nettement hétérotypiques, à la

¹Dans les figures de Golski, elle est plus vaste que je ne l'ai jamais observée.

prophase. Les chromosomes de la métaphase (figure C) sont un peu différents de ceux que décrit Conklin. A l'anaphase (figures D et E), les moitiés des chromosomes se sont transformées en petites sphères. A la seconde métaphase (figure F), les chromosomes ont la forme de petits bâtonnets. Fait intéressant, mais auquel je ne veux pas m'attarder pour le moment, ils sont beaucoup moins nombreux que dans la première division.

La situation des fuseaux est d'abord tangentielle à la surface de l'œuf. Le premier fuseau est parfois situé d'abord à une certaine distance de cette surface; je ne l'ai cependant jamais trouvé au milieu de l'œuf, comme le décrit Golski.

La forme du premier fuseau est, comme l'ont représenté Golski et Conklin, celle d'un petit tonnelet. Ce tonnelet se termine, d'après moi, d'une façon régulièrement arrondie à ses deux pôles. Pas plus que Conklin, je ne puis trouver trace des "centrosomes" décrits



FIG. E.—Œuf fixé après 15 minutes.
Télophase de la première division.
Imm. 2 mm., œ. 18.

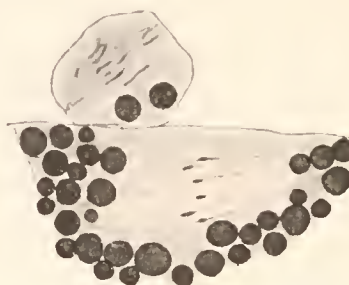


FIG. F.—Œuf fixé après 20 minutes.
Métaphase de la seconde division.
Méthode de Benda. Imm. 2 mm.,
œ. 18.

par Golski, ni de l'"archoplasm" de Castle: à la métaphase (figure C), j'ai pourtant observé une très légère irradiation. Comme Golski, j'ai observé les renflements des filaments fusoriaux qui forment le corpuseule intermédiaire (figure D), et, dans le premier globule polaire, l'indice d'une figure de division (figure F).

La forme du second fuseau est très différente de celle du premier (cf. figures C et F). Ce fuseau est plus long et plus élancé que le premier. Il est aussi plus étroitement entouré par les grains vitellins.

FÉCONDATION.

Ni Boveri, ni Castle, ni même Golski n'ont observé les premiers stades de la fécondation. Le plus jeune stade observé par Boveri et par Castle correspond à peu près aux œufs fixés 20 à 25 minutes après l'addition du sperme, dans mes expériences; celui observé par Golski, aux œufs fixés après 15 minutes.

Comme Golski n'a pas reconnu la structure particulière de l'œuf, il ne peut préciser l'endroit où se fait la pénétration du spermatozoïde. Au premier stade qu'il figure, la tête du spermatozoïde a déjà exécuté sa rotation. Dans la figure 8, il dessine un fin filament, vraisemblablement la queue, qui n'est pas mentionné dans le texte.

Bientôt le noyau mâle gonfle et prend une structure réticulée. En même temps, il s'enfoncerait dans l'œuf pour rejoindre le pronucleus femelle. Celui-ci a sur ces entrefaites gonflé et devient lobulé. Il n'est plus accompagné d'irradiations: les centrosomes de la première division de segmentation proviennent de celui du spermatozoïde. Les deux pronuclei se rejoignent sans se fusionner, puis viennent se placer au centre de l'œuf, où se forme le premier fuseau de segmentation.

Comme nous le verrons plus loin, cette description des mouvements des pronuclei est tout-à-fait inexacte. Elle est évidemment en rapport avec le fait que Golski n'a pas reconnu la polarité de l'œuf. Je ferai remarquer que cette description est d'ailleurs en contradiction avec une des figures même de l'auteur: la figure 13, qui montre que le noyau mâle avec ses irradiations est le plus proche de la périphérie de l'œuf.

Castle le premier a constaté que le spermatozoïde de *Ciona* pénètre toujours au voisinage du pôle végétatif. Cette constatation a été corroborée par Conklin pour *Ciona* et pour *Cynthia*. La pénétration du spermatozoïde se fait, d'après Conklin, deux à cinq minutes après l'addition du sperme. La tête est tout d'abord en forme de bâtonnet, puis gonfle et forme une vésicule de structure réticulée. Elle est parfois accompagnée d'un mince filament, partant d'une de ses extrémités et s'étendant vers la surface de l'œuf, qui est la pièce intermédiaire et peut-être une partie de la queue. Autour de la pièce intermédiaire se forme un aster qui grandit rapidement et s'étend à travers le plasma clair jusque dans le vitellus. Au centre des irradiations, on distingue un petit corpuseule, le "centrosome."

Ces phénomènes sont accompagnés de mouvements du spermatozoïde. Il est d'abord entré radiairement dans l'œuf, à travers la couche granuleuse: c'est le "penetration-path." Puis il suit une direction formant avec la précédente un angle plus ou moins marqué suivant l'endroit du pôle végétatif où il est entré: c'est le "copulation-path." Spermatozoïde et aster se meuvent en longeant la surface de l'œuf, vers l'équateur. Dans ce mouvement, comme nous l'avons vu plus haut, une grande partie du plasma jaune est entraînée.

Conklin signale chez *Ciona* la particularité suivante: Le spermatozoïde est entouré d'un protoplasme clair à structure alvéolaire, qu'il emporte avec lui au centre du croissant. Conklin croit retrouver cette même substance dans une calotte de protoplasme différencié qu'il observe de chaque côté de la ligne médiane, au pôle postérieur de l'embryon segmenté en 8. Elle correspond à celle décrite par Castle sous le nom de "clear protoplasm" et passe finalement dans les "small posterior mesenchyme cells" (cellules B7.6 dans la nomenclature de Conklin), qui occupent le pôle postérieur de la gastrula.

Tandis que le pronucleus mâle est le siège de ces mouvements, le pronucleus femelle, contrairement à la description de Golski, ne reste pas immobile. Complètement dépourvu d'irradiations et entièrement perdu dans le vitellus, il s'avance vers la zone claire occupée par le pronucleus mâle. Les deux pronuclei se rejoignent au niveau de l'équateur de l'œuf, à mi-distance entre le centre et le pôle postérieur, le noyau femelle se trouvant invariablement placé vers le centre. Auparavant déjà, le centrosome mâle s'est divisé.

L'étude de Conklin que je viens de résumer portait sur les phénomènes chromatiques et achromatiques de la fécondation. Avec le travail de Meves sur *Phallusia* (1913), nous arrivons dans l'ère des récentes recherches sur le rôle de la partie protoplasmique du spermatozoïde dans la fécondation.

J'ai eu l'occasion de résumer plus haut les observations de Meves sur la structure du spermatozoïde et de l'œuf de *Phallusia*. Conformément aux observations de Castle et de Conklin sur d'autres Ascidiens, Meves voit chez *Phallusia* le spermatozoïde entrer au pôle végétatif. Il est logé dans une dépression de la couche mitochondriale, et se retrouve entier, queue comprise. La tête subit une rotation telle que son extrémité antérieure est tournée vers la périphérie de l'œuf. Ce n'est qu'après une demi-heure que le noyau mâle s'enfonce dans l'ovoplasme (et il s'enfoncera plus profondément que chez *Ciona*). Il est entouré d'une zone claire, au centre de laquelle se trouve un spermocentre avec irradiations.

Entre temps, la tête est devenue plus courte et a augmenté de volume. Sa gaine mitochondriale, fortement colorée en rouge dans les préparations à la méthode d'Altmann,

apparaît maintenant sous forme de stries transversales, le plus souvent trois, parfois deux ou quatre. Ces anneaux opposent visiblement une certaine résistance au gonflement de la tête, car elle prend un aspect moniliforme. Mais plus tard, le gonflement s'accroissant, elle devient régulièrement cylindrique. Au centre de ce cylindre se voit un bâtonnet grêle, qui en forme l'axe: c'est pour Meves le noyau, la tête proprement dite, le restant étant une gaine cytoplasmique.

A mesure que la tête gonfle, les anneaux sont devenus plus larges et finalement plus larges que la tête elle-même.

A un stade plus avancé, la tête est dépourvue de ces anneaux et une lacune entre ce stade et le précédent a empêché Meves de déterminer exactement leur sort. Mais immédiatement après leur disparition, Meves trouve dans le champ clair, autour du spermocentre, outre des mitochondries, de fins bâtonnets, d'abord peu nombreux mais augmentant rapidement en nombre, disposés radiairement par rapport au spermocentre. Meves émet l'hypothèse qu'une partie au moins de ces bâtonnets pourrait provenir des anneaux du spermatozoïde.

Quand le spermocentre se divise, les bâtonnets en question se répartissent en deux amas. Leur nombre continue à augmenter. On les retrouve aux pôles de la première division de segmentation.

J'en arrive maintenant à mes propres observations.

J'ai trouvé le spermatozoïde pour la première fois dans des œufs fixés après 5 minutes. Les œufs que j'avais fixés après 2 et 3 minutes étaient à la vérité conservés par le liquide d'Altmann et n'étaient pas utilisables. Je crois en tous cas que ces portions fixées après 5 minutes m'ont montré les tous premiers stades. Dans une de ces portions, fixée par le liquide de Benda, j'ai observé deux catégories d'images. Tantôt (ce sont les images les plus rares), le spermatozoïde est placé parallèlement à la surface de l'œuf; tantôt, plus ou moins perpendiculairement et logé dans une des dépressions de la couche mitochondriale du pôle végétatif (figures 8 et 9). Si l'on examine des œufs fixés un peu plus tard, après 10 minutes par exemple, on ne trouve plus que des images de cette catégorie. J'en conclus que les premières représentent un stade plus jeune.

Quand la tête s'est engagée dans la dépression de la couche mitochondriale,¹ on constate qu'elle a subi un mouvement de rotation (cf. Conklin et Meves) tel que son extrémité antérieure est plus ou moins directement dirigée vers la surface de l'œuf (figures 8 et 10). En même temps, la dépression de la zone mitochondriale s'est légèrement agrandie et il s'y est développé un système d'irradiations, peu nettes à la vérité dans mes préparations aux liquides osmiques. Ces irradiations convergent d'une part vers un centrosome et s'étendent d'autre part dans l'ovoplasme, dont les éléments figurés prennent une disposition radiaire. La figure 10, représentant une coupe à travers un œuf fixé après 10 minutes, montre une image de ce genre.

Au stade ultérieur, représenté figure 11, le système d'irradiations s'est déplacé vers le centre de l'œuf et a franchi la couche mitochondriale périphérique. Une traînée claire indique l'endroit où le spermatozoïde a pénétré. Si l'on cherche la tête à ce stade, on éprouve de grandes difficultés, que Meves a également signalées. Comme déjà Boveri l'a fait remarquer, elle est fort peu chromophile, de telle sorte que, même dans des préparations colorées par la safranine, et *a fortiori* dans celles traitées par les méthodes de Benda ou

¹Il m'est arrivé de rencontrer le spermatozoïde dans cette couche, ou même plus profondément, dans le vitellus. Cette disposition n'est pas très rare et rend évidemment sa découverte très malaisée.

d'Altmann, elle échappe facilement à l'observation.¹ Une circonstance augmente encore la difficulté. Parfois, comme dans la figure 11, la tête occupe la traînée claire qui traverse la couche mitochondriale: c'est un cas relativement favorable. Mais souvent, elle occupe d'autres points de l'extrême périphérie du système d'irradiations et se trouve recouverte, non seulement par les mitochondries, comme dans le cas présent, mais encore par les grains vitellins.

Dans la suite, l'irradiation s'étend à plus de la moitié de l'œuf (figure 12). Le noyau mâle a pénétré un peu plus profondément, au point de se dégager de la couche mitochondriale: il est maintenant facile de le trouver. Avec Conklin, je suis d'accord sur les deux points suivants: d'abord, le pronucleus mâle ne s'enfoncera pas davantage dans l'œuf avant que le pronucleus femelle ne soit venu le rejoindre; ensuite, le pronucleus mâle subit un déplacement latéral le long de la surface de l'œuf, vers l'équateur.

Le premier point est en désaccord avec les observations de Golski. Il est cependant facile à vérifier, quand on a reconnu la polarité de l'œuf. On voit nettement, dans les préparations traitées par la méthode de Benda par exemple, que le noyau mâle ne quitte pas la couche mitochondriale du pôle végétatif. D'autre part, on peut retrouver toutes les étapes de la migration du noyau femelle à travers l'œuf; 30 minutes après l'addition du sperme, dans mes préparations, le pronucleus femelle est formé (figure 12); 5 minutes plus tard, il s'est déjà profondément engagé dans l'œuf (figure G). Comme le dit Conklin, il ne présente pas traces d'irradiations et il est immédiatement entouré par les grains vitellins.² Il laisse cependant derrière lui, comme le montre la figure G, une traînée dépourvue de ces grains, une trace du chemin qu'il a fait.

En ce qui concerne le second point, il est moins facile à établir sur des coupes que sur l'œuf entier. Je trouve cependant dans mes préparations certains faits qui concordent avec la manière de voir de Conklin. La situation du noyau mâle au voisinage de l'équateur de l'œuf se reconnaît, pour autant que les coupes soient favorablement orientées, à partir de 30 minutes. La plupart des œufs montrent de plus au niveau du noyau mâle un épaississement de la couche mitochondriale, correspondant au "crescent" de Conklin. Enfin, on trouve d'une manière constante dans cette couche, une traînée claire:³ le "clear protoplasm" de Castle, le protoplasme alvéolaire de Conklin. Tandis que ces auteurs la considèrent comme une substance spéciale, qui passera dans les "small mesenchyme cells," elle est pour moi due tout simplement au refoulement des éléments figurés de l'ovoplasme par le spermatozoïde: c'est la même traînée, moins développée, que j'ai déjà signalée plus haut, à un stade moins avancé. Réservant la discussion de l'interprétation de Castle et de Conklin

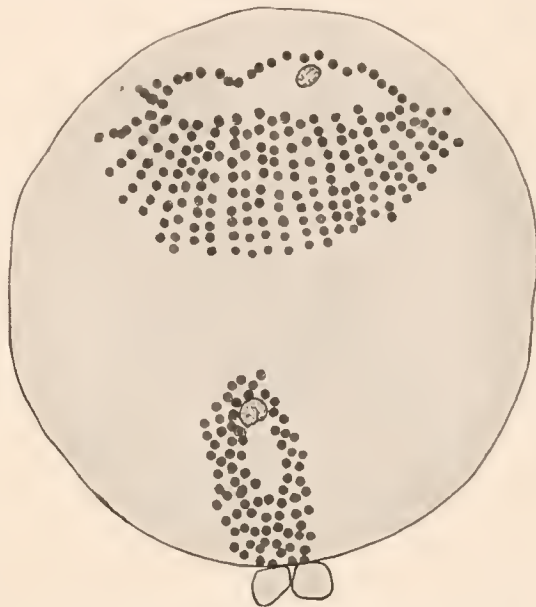


FIG. G.—Œuf fixé après 35 minutes. Pronucleus femelle se dirigeant vers le pronucleus mâle. Méthode de Benda. Imm. 2 mm., œ. 4.

¹Castle, dont la figure 2 représente un stade analogue, ne l'a pas vue.

²Ce qui explique que Boveri, étudiant un stade analogue, ne l'a pas trouvé.

³Elle n'était pas visible dans la coupe représentée figure 12, mais dans la coupe suivante du même œuf.

pour tantôt et m'en tenant pour le moment au point qui nous occupe, le déplacement du spermatozoïde, je ferai remarquer que la traînée en question n'est pas dans sa plus grande partie perpendiculaire, mais tangentielle à la surface de l'œuf (figures 13 et 14). Dans la figure 14, on peut même distinguer le "penetration-path," très court et radiaire, du "copulation-path," beaucoup plus long et tangentiel.

Déjà avant le stade représenté dans la figure 13 (œuf fixé après 45 minutes), le centrosome s'est divisé: dans cette figure, un seul centrosome se trouve dans la coupe. Pronuclei et centrosomes se rapprochent ensuite du centre de l'œuf, où ils constituent, 55 à 60 minutes après l'addition de sperme, la figure karyokinétique de la première segmentation (figure 14).

J'ai laissé à dessein de côté jusqu'à présent tout ce qui concerne la structure du spermatozoïde. J'y arrive maintenant.

Il résulte tout d'abord de mes observations que le spermatozoïde entre tout entier dans l'œuf, tête et queue. La queue est un long et mince filament, qui nous permet de reconnaître la partie postérieure de la tête du spermatozoïde (figures 8 et 10). Jusqu'au stade de 10 minutes, je l'ai trouvée d'une manière constante; il va de soi qu'elle n'est pas toujours visible dans la même coupe que la tête.

La tête elle-même présente une structure que ni Golski ni Conklin n'ont reconnue. C'est un élément allongé et légèrement recourbé, dans lequel on distingue, malaisément au début, facilement quand la tête est gonflée, deux parties: un bâtonnet et une petite vésicule. L'ensemble rappelle assez bien un grain d'orge allongé. Le bâtonnet est un élément fortement colorable par l'hématoxyline ferrique après fixation au liquide de Flemming (figure 10), et par les méthodes de Benda (figure 9) et d'Altmann (figure 8); il apparaît aussi, quoique moins électivement, par la safranine. La vésicule, elle est peu chromophile. Dans les préparations traitées par la méthode d'Altmann, elle est à peine visible (figure 8). La méthode de Benda la colore légèrement en brun (figure 9). Par l'hématoxyline ferrique, elle prend une teinte grise moins vive que celle du bâtonnet, qui est franchement noir (figure 10).

L'épaisseur de la vésicule dépasse de peu au début celle du bâtonnet, mais comme elle gonfle, la différence s'accroît rapidement. Des coupes passant perpendiculairement au grand axe de la tête nous renseignent sur les rapports de ses constituants (figure 9): on voit alors que le bâtonnet est appliqué à la surface de la vésicule.¹

Si nous comparons les dimensions de l'élément que je viens de décrire, les réactions colorantes des deux parties qui le constituent et leurs rapports, à la description du spermatozoïde donnée plus haut, nous arrivons à cette conclusion que la vésicule représente le noyau, le bâtonnet, le corps mitochondrial du spermatozoïde. Cette conclusion est encore appuyée par l'évolution ultérieure de la vésicule, qui montre qu'il s'agit bien là du pronucleus mâle. *Le spermatozoïde apporte donc dans l'œuf, au moment de la fécondation, son corps mitochondrial.*

On pourrait objecter à cette conclusion, en se basant sur la comparaison des figures 10 de mon travail et du travail de Meves, que le bâtonnet représente le noyau, la vésicule une gaine protoplasmique. Les arguments présentés ci-dessus me paraissent renverser cette objection; tout spécialement, l'examen des coupes transversales me paraît convainquant. Je ne vois d'ailleurs pas où il faudrait alors chercher le corps mitochondrial du spermatozoïde, qui, comme le montre l'étude de la spermiogénèse, est étroitement accolé au noyau (d'autant plus que les mitochondries de l'œuf sont parfaitement colorées dans ces préparations).

¹Il s'agit bien dans cette figure d'une coupe transversale de la tête, comme le montrent les changements de la mise au point et la présence de la queue dans la coupe suivante.

C'est à ce moment que la lacune due à la mauvaise réussite de la fixation par le liquide d'Altmann se montre particulièrement regrettable. Les portions traitées par la méthode de Benda sont insuffisantes pour la combler. Une portion fixée après 15 minutes n'est guère plus avancée que les portions fixées après 10 minutes et les portions suivantes sont de 20 minutes. Or, à ce stade (figure 11), si je retrouve la vésicule, c'est-à-dire le pronucleus mâle, légèrement augmenté de volume (remarquer que cette figure est dessinée à un grossissement plus faible que la précédente), je n'ai pu, malgré les recherches les plus minutieuses, retrouver le bâtonnet mitochondrial. Je ne puis affirmer qu'une chose: c'est qu'il n'est plus fixé au pronucleus.

Meves a constaté, en concordance avec la disparition des anneaux mitochondriaux du spermatozoïde, l'apparition de longs et fins bâtonnets. Je trouve aussi dans mes préparations des bâtonnets, mais ils sont beaucoup plus courts et plus trapus que ceux de Meves et je pense qu'ils sont tout simplement dus à la confluence de mitochondries qui s'étaient alignées entre les irradiations.

Le pronucleus mâle continue à gonfler. Jusqu'au stade de 30 minutes (figure 12), il est homogène et toujours remarquablement peu chromophile. A partir de ce stade, on y observe une structure. Puis, il prend un aspect lobulé (figure 13), déjà signalé par Golski. Le pronucleus femelle présente le même aspect (figure 13). Il n'y a pas de fusion des pronuclei. Comme il a été dit plus haut, la figure karyokinétique va occuper le milieu de l'œuf.

SEGMENTATION.

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES RELATIVES À LA SEGMENTATION DES ASCIDIENS.

Van Beneden et Julin (1884, 1) sont les premiers auteurs qui se soient efforcés de déterminer cellule par cellule le sort des produits de la segmentation de l'œuf. Sans entrer dans les détails de leurs observations, voici leurs principaux résultats. Le plan médian de l'embryon futur correspond au plan de symétrie bilatérale de l'œuf et aussi au premier plan de segmentation: l'œuf est par conséquent divisé par ce premier plan en moitié gauche et moitié droite. "Des deux premiers blastomères," écrivent Van Beneden et Julin (pages 113-114), "parfaitement semblables entre eux, l'un renferme la substance aux dépens de laquelle se forme la moitié droite, l'autre les matériaux destinés à l'édification de la moitié gauche du corps de la larve." Le second plan de segmentation est perpendiculaire au plan médian et donne deux cellules antérieures et deux cellules postérieures. Le troisième plan donne naissance à quatre cellules dorsales et à quatre cellules ventrales: ces dernières sont de nature ectodermique, les autres de nature mixte.

Les conclusions de Van Beneden et Julin, confirmées tout d'abord par Chabry, furent ensuite critiquées par Seeliger, Samassa et Castle, qui donnèrent de l'œuf une orientation toute différente (bibliographie complète dans Conklin, 1905, 1). Mais la perfection du travail des auteurs belges fut démontrée par Conklin. Cet auteur admet sans réserves l'orientation de Van Beneden et Julin. Il en diffère à la vérité sur le sort de certaines cellules.

Il n'est jamais entré dans mes intentions de refaire une étude détaillée de la segmentation chez les Ascidiens. Mon but était d'étudier la répartition des chondriosomes et de rechercher quels pouvaient être les rapports de ces éléments avec les "organ-forming substances" de Conklin. Aussi bien, les observations que j'ai eu l'occasion de faire sur le développement concordent avec celles de Conklin et, dans les grandes lignes, avec celles de Van Beneden et Julin.

Tandis que ces derniers auteurs n'avaient suivi le développement cellule par cellule que jusqu'au stade 44, Conklin a pu le suivre à peu près de bout en bout. Une circonstance favorable fut la découverte dans l'œuf de *Cynthia partita* de substances de coloration différente, qui, se répartissant d'une manière régulière au cours de la segmentation, permettent de suivre le sort des différents blastomères. L'étude des coupes, non seulement chez *Cynthia*, mais aussi chez *Ciona*, lui permit de retrouver des différences de structure en rapport avec la localisation de ces différents plasmes.

Avant de passer au résumé de ses observations, qui sont pour nous très importantes, je rappellerai que déjà d'autres auteurs avaient signalé certaines particularités de structure dans l'œuf et dans les différents blastomères des Ascidiens. J'ai déjà rappelé plus haut que Castle avait reconnu l'existence dans l'œuf d'une zone spéciale de protoplasme granuleux, et plus tard, d'une substance claire, passant dans les "small mesenchyme cells." Il signale encore au cours de son travail que les cellules de l'endoderme sont criblées de vitellus, de même que les cellules de la chorde, et mentionne une affinité spéciale des cellules du mésenchyme pour l'hématoxyline. Antérieurement, Van Beneden et Julin (1884, 1, p. 118, voir aussi 1887) ont décrit que les cellules des deux rangées qui bordent le blastopore sont très avides de carmin et Klaatsch (1897) a signalé que les cellules musculaires se distinguent *in vivo* par une coloration foncée.

Les observations de Conklin sur ce point sont beaucoup plus précises et remontent à la structure de l'œuf. Je suivrai dans ce résumé la description qu'il donne des faits observés chez *Cynthia* (1905, 1).

L'œuf fécondé, je le rappelle, renferme trois substances principales de coloration différente: une substance jaune, localisée principalement dans l'hémisphère végétatif, en un point voisin de l'équateur; une substance claire, qui occupe au moment de la première segmentation le centre de l'œuf, et enfin une substance gris foncé, qui remplit le restant de l'œuf.

Comme il a été dit, les observations de Conklin concordent avec celles de Van Beneden et Julin: le plan de symétrie de l'œuf correspond au plan de symétrie de l'embryon et le premier plan de segmentation coïncide avec ces plans. Il répartira par conséquent les différents plasmes contenus dans l'œuf d'une manière égale entre les deux premiers blastomères (figure H), et chacun de ceux-ci va donner naissance à la moitié correspondante de l'embryon. Comme d'autre part, l'étude ultérieure du développement montre que le pôle végétatif correspond au côté dorsal, le pôle animal au côté ventral de l'embryon et que le croissant jaune occupe la partie postérieure de celui-ci, il suit de là que déjà dans l'œuf fécondé, on peut distinguer face dorsale et face ventrale, extrémité antérieure et extrémité postérieure, côté droit et côté gauche.

La seconde division est, comme la première, une division méridionale, mais dans un plan perpendiculaire à celui de la précédente. L'œuf est partagé en quatre blastomères, deux antérieurs et deux postérieurs, disposés comme quatre quartiers d'orange autour de l'axe dorso-ventral de l'œuf.

Au point de vue cytologique, on constate que les fuseaux sont logés dans une masse de protoplasme clair, plus voisine du pôle animal que du pôle végétatif. Le pôle végétatif est de

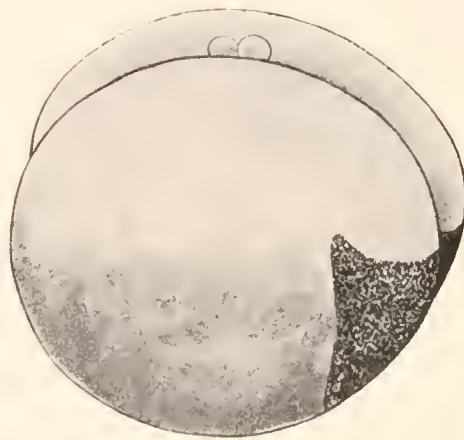


FIG. II.—Œuf de *Cynthia*. Stade 2, d'après Conklin (1905, 1).

beaucoup le plus riche en vitellus. Quand la division est consommée, on constate une légère différence de volume entre les blastomères: les antérieurs sont plus volumineux. De plus, fait important, les blastomères antérieurs diffèrent qualitativement des postérieurs. Les cellules antérieures renferment plus de vitellus que les cellules postérieures; celles-ci par contre ont emporté presque tout le protoplasme jaune. Le protoplasme clair est réparti à peu près également entre ces deux catégories de cellules.

La troisième division se fait suivant un plan équatorial et divise l'œuf en quatre cellules dorsales ou végétatives et quatre cellules ventrales ou animales (figure J). Cette division est, comme la précédente, une division différentielle: elle produit des blastomères qualitativement inégaux. Les quatre cellules ventrales sont riches en protoplasme clair, les antéro-dorsales en vitellus. Point important: dans ces six cellules il reste un peu de plasmé jaune, localisé autour du noyau. Dans les cellules postéro-dorsales (cellules B4.1, dans la nomenclature adoptée par Conklin), on trouve beaucoup de plasmé jaune. De plus, chez *Ciona*, il existe à la partie postérieure de ces cellules une petite zone de protoplasme différencié: dans l'œuf frais, cette zone est claire et difficilement visible; dans les préparations, elle apparaît au contraire fortement colorée. Il a déjà été question de cette zone plus haut: Conklin la fait dériver du "clear protoplasm" qui entoure le spermatozoïde, bien qu'il ne la retrouve chez *Ciona* qu'au stade 8, chez *Cynthia* qu'au stade 16. Déjà vue auparavant par Castle, elle passe, d'après les observations concordantes des auteurs américains, dans les cellules mésenchymatiques postérieures, au stade 64 (cellules B7.6).

Les quatre cellules du pôle animal et celles du pôle végétatif se divisent en même temps. L'embryon est alors formé de 16 cellules disposées en deux couronnes superposées. Les huit cellules du pôle animal ont la même constitution qu'au stade précédent et sont toutes semblables entr'elles (figure K). Au pôle végétatif (figure L), les produits de la division des cellules postérieures sont quantitativement et qualitativement inégaux. B4.1 forme en se divisant la cellule médiale B5.2 et la cellule latérale B5.1. Cette dernière est plus volumineuse que l'autre. Au point de vue qualitatif, elle renferme environ parties égales de vitellus et de plasmé jaune, tandis que B5.2 reçoit presque exclusivement du plasmé jaune et, en outre, la petite calotte de plasmé foncé dont il a été question au stade précédent. Dans tous les blastomères, le plasmé jaune entoure étroitement le noyau.

La situation des différents plasmes dans la larve au stade 16 est donc, d'après Conklin, la suivante: Le protoplasme clair se trouve surtout dans les cellules de la moitié animale de l'œuf et dans la partie antérieure de la moitié végétative. La partie moyenne de l'hémisphère végétatif est surtout riche en vitellus. La majeure partie du plasmé jaune est localisée dans la partie postérieure du même hémisphère. La situation de ces différents plasmes par rapport aux axes de l'œuf ne changera plus, nous dit Conklin, jusqu'à la gastrulation. Mais, quand les cellules se divisent, on constate que certaines divisions sont des divisions différentielles, amenant la localisation des plasmes dans certaines cellules, destinées à former des organes déterminés.

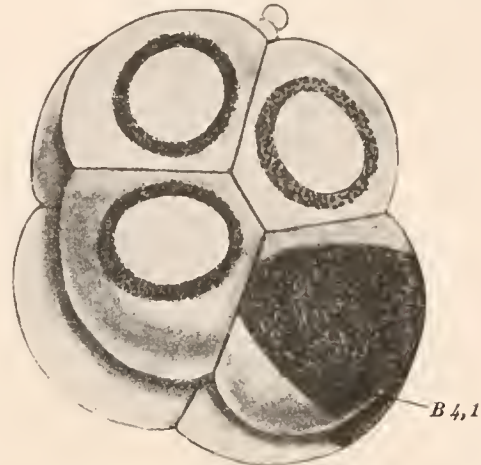


FIG. J.—Œuf de *Cynthia*. Stade 8, vue latérale droite, d'après Conklin (1905, 1).

Sans entrer dans les détails, pour lesquels je renvoie à l'original, je me bornerai à indiquer à quel moment se produisent et en quoi consistent, d'après Conklin, ces divisions différentielles.

Au cours de la cinquième division, les cellules antérieures de l'hémisphère végétatif fournissent 8 cellules, dont 4, placées juste sous l'équateur de l'œuf, renferment parties égales de vitellus et de protoplasme et donneront naissance à une partie de la chorde et du système nerveux, tandis que les quatre autres, plus riches en vitellus, sont des cellules endodermiques.

Des cellules postérieures du même hémisphère, B5.1 se divise de telle sorte que l'axe de la mitose soit dirigé transversalement. La cellule externe emporte presque toute la substance du croissant et peu de vitellus; dans la cellule interne, qui est une cellule endodermique, on observe la proportion inverse.

Au cours de la sixième division, les cellules chordo-neurales formées au stade précédent se divisent en quatre cellules ventrales et quatre cellules dorsales. Les premières sont petites et ne contiennent presque pas de vitellus: elles donneront naissance à la partie postérieure de la plaque nerveuse. Les autres, plus volumineuses et chargées de vitellus, formeront la chorde.

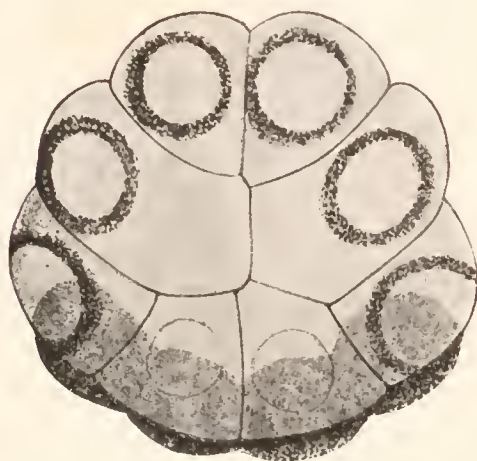


FIG. K.—Œuf de *Cynthia*. Stade 16, vu du pôle animal, d'après Conklin (1905, I).

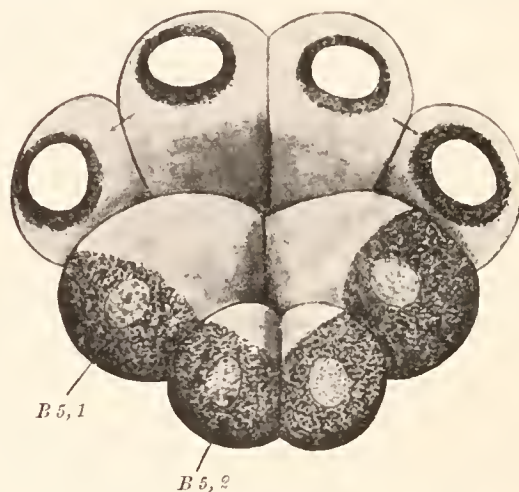


FIG. L.—Œuf de *Cynthia*. Stade 16, vu du pôle végétatif, d'après Conklin (1905, I).

Dans les cellules riches en plasma jaune, on observe aussi une division différentielle. B6.2 donne deux cellules de volume égal, mais dont l'une, dorsale (B7.3), contient moins de plasma jaune que la ventrale B7.4. B7.3 est une cellule du mésenchyme, B7.4 une future cellule musculaire. Des divisions différentielles de même valeur se produisent plus tard dans d'autres cellules de l'extrémité postérieure de l'hémisphère végétatif.

Conklin signale également à ce stade une division différentielle dans les cellules endodermiques latérales: des cellules-filles, l'interne est riche en vitellus et reste cellule endodermique; l'externe contient plus de protoplasme et formera, d'après Castle, du mésenchyme.

Avec la septième division, on arrive au début de la gastrulation. Dans la gastrula, les ébauches des différents organes sont formées et les cellules qui constituent ces ébauches se distinguent nettement *in vivo* par une coloration spéciale (figure M). Les cellules endodermiques ont, d'après Conklin, une teinte gris foncé et sont gorgées de vitellus. Les cellules de la chorde renferment un peu moins de vitellus et sont un peu plus claires que les précédentes. Les cellules ectodermiques et les cellules neurales sont riches en protoplasme

et claires, mais de nuance différente. Les cellules musculaires ont la teinte jaune foncé du croissant, tandis que les cellules mésenchymatiques sont de nuance plus claire.

Conklin insiste sur une différence entre Castle et lui: elle porte sur les cellules que Castle appelle neuro-musculaires. Castle désigne sous ce nom un anneau de cellules circonscrivant le blastopore et se continuant en avant avec la plaque médullaire. Cet anneau, déjà signalé par Van Beneden et Julin chez *Clavellina*, était considéré par ces auteurs comme entièrement nerveux. Pour Castle, les cellules qui forment les bords et la lèvre postérieure du blastopore, donnent naissance, non seulement à la musculature de la larve, mais encore à la partie postérieure du système nerveux. Conklin est d'un autre avis. La coloration jaune caractéristique de ces cellules permet de suivre facilement leur évolution ultérieure: elles formeront exclusivement les cellules musculaires, qui passent dans la queue de la larve. Conklin confirme ainsi les observations de Klaatsch (1897), qui le premier, à ma connaissance, a décrit ces cellules comme cellules musculaires.

Pendant les stades ultérieurs, les cellules continuent évidemment à se diviser et elles subissent en même temps des modifications dans leur situation: c'est ainsi que les cellules musculaires sont refoulées dans la queue. Les différentes espèces de cellules continuent néanmoins à être reconnaissables par leur coloration.

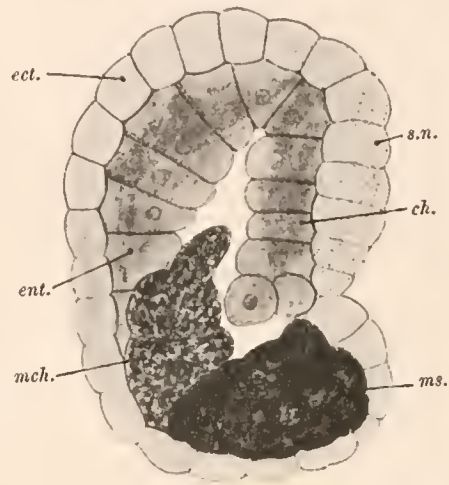


FIG. M.—Gastrula de *Cynthia*, d'après Conklin (1905, 1).

ect. = ectoderme; ent. = endoderme; ch. = chorde; s. n. = système nerveux; ms. = cellules musculaires; mch. = cellules du mésenchyme.

Des observations de Conklin, il résulte que l'œuf des Ascidiens est "ein Musterbeispiel determinativer Entwicklung" (Korschelt et Heider). Cette conclusion est corroborée par les recherches expérimentales du même auteur (1905, 3, 1906, 1911). Contre Driesch et Crampton et conformément aux expériences de Chabry, Conklin montre que les blastomères des Ascidiens ont une potentialité limitée: $\frac{1}{2}$ blastomère ne donne naissance qu'à une demi-larve.

OBSERVATIONS PERSONNELLES.

Ce long exposé des observations de Conklin était, je pense, indispensable pour la compréhension de ce qui va suivre. Je passe maintenant à l'exposé de mes observations personnelles.

Une coupe favorable d'un œuf en voie de segmentation montre la disposition suivante (figure 14): Au centre, le fuseau; aux pôles du fuseau, deux espaces clairs, les centrosomes et leurs irradiations. Entre l'hémisphère animal et l'hémisphère végétatif, on constate, dans les préparations colorées par la méthode de Benda, une différence très nette. Tandis que le premier est surtout occupé par des grains vitellins, le second renferme une quantité considérable de mitochondries: la coloration violette de cet hémisphère tranche nettement sur la coloration brune de l'hémisphère opposé. Des mitochondries se trouvent aussi, quoiqu'en faible abondance, dans l'hémisphère animal, entre les grains vitellins, et autour des centrosomes: comme déjà antérieurement, un certain nombre de celles-ci sont alignées en chaînettes ou fusionnées de façon à former des bâtonnets.

L'hémisphère végétatif de ces œufs présente d'une manière constante un détail de structure, qui se voit très bien dans la figure 14: je veux parler de la traînée claire qui fend la masse mitochondriale et dont il a déjà été question plus haut. Cette traînée persiste jusqu'à la fin de la première segmentation et le premier plan de division la coupe en deux; mais, et c'est là un point qui, comme nous le verrons plus tard, a son importance, elle disparaît ensuite complètement.

De ce qui vient d'être dit, il résulte que, conformément aux observations de Van Beneden et Julin et de Conklin, la première division est une division quantitativement et qualitativement égale.

La figure 15 représente une coupe intéressant un des blastomères de l'œuf segmenté en deux, suivant l'axe du second fuseau de segmentation. Comme dans toutes les figures, le pôle animal est tourné en haut, le pôle végétatif en bas. Une moitié de ce dernier hémisphère est particulièrement riche en mitochondries, occupant une situation identique à celle du croissant jaune de *Cynthia*. Par suite de cette disposition et de la direction du fuseau, il est clair que cette seconde division sera une division différentielle.

Outre les nombreuses mitochondries accumulées au niveau du croissant, on en trouve encore entre les grains vitellins, plus nombreuses au pôle végétatif qu'au pôle animal, et à la périphérie de l'espace clair qui circonscrit le fuseau. On remarquera, chose que la figure 15 montre très clairement, que l'espace en question est beaucoup plus étendu que celui que l'on observe autour du premier fuseau. Il est de plus presque entièrement reporté dans la moitié animale de l'œuf.

Je n'insiste pas sur la similitude qui existe entre cette description et celle de Conklin. Il suffit de comparer la figure 15 de ce travail à la figure H empruntée à Conklin pour s'en rendre compte.

Je ne m'arrête pas à la troisième division (passage du stade 4 au stade 8) et j'en viens immédiatement à la description de l'œuf divisé en 16 blastomères (figures 16 et 17).

La figure 16 représente une coupe intéressant les 8 cellules de l'hémisphère végétatif. L'extrémité antérieure est tournée vers le haut de la planche. Les quatre cellules antérieures sont sensiblement d'égal volume. On peut y distinguer trois zones: une zone externe renfermant des grains vitellins, une zone moyenne presque entièrement dépourvue d'éléments figurés, et une zone périnucléaire renfermant des mitochondries étroitement serrées les unes contre les autres.

Les quatre cellules postérieures sont de volume inégal, les deux médiales étant plus petites. Elles se distinguent toutes les quatre des précédentes par leur plus grande richesse en mitochondries. Celles-ci entourent étroitement le noyau, mais elles sont tellement abondantes qu'elles remplissent presque toute la cellule. A la périphérie des cellules latérales, on trouve aussi une couche formée de grains vitellins; les deux cellules médiales n'en renferment que quelques-uns. Ces deux dernières présentent encore un autre détail de structure: au voisinage de la ligne médiane, symétriquement placée par rapport à celle-ci, se trouve dans chacune une petite calotte de protoplasme ne renfermant pas d'éléments figurés et se distinguant de la masse commune par une coloration plus foncée.

Si nous comparons cette description à celle de Conklin, nous sommes encore une fois frappés par une concordance presque absolue. Concordance d'abord dans la forme et les dimensions relatives des cellules: on voudra bien comparer la figure 16 à la figure L, extraite du travail de l'auteur américain. Concordance ensuite dans la répartition des différentes substances. Le plasme jaune est localisé autour du noyau dans les cellules antérieures et il est extrêmement abondant dans les cellules postérieures: c'est la disposition des mitochon-

dries. Je constate également la rareté du vitellus dans les cellules postérieures et médiales. Enfin, je trouve dans ces cellules une zone différenciée, la calotte décrite plus haut, qui correspond indubitablement à la zone de situation identique décrite par Conklin.

Je ne suis par contre pas du tout d'accord avec cet auteur, quand il fait dériver la substance qui forme cette calotte du "clear protoplasm" qu'il observe dans l'œuf fécondé. Tout d'abord, Conklin ne démontre nullement cette continuité: la substance en question disparaît, pour ne réapparaître qu'après plusieurs divisions. Je rappelle de plus ce que j'ai dit plus haut: le "clear protoplasm" correspond à la traînée laissée par le spermatozoïde, et il n'y a aucune raison de la considérer comme une substance spéciale. Elle disparaît d'ailleurs après la première segmentation. Enfin, les caractères de colorabilité de ces deux zones sont, dans mes préparations, différents.

Dans les cellules de l'hémisphère animal, l'identité, pour être moins frappante parce que ces cellules ont des caractères moins spéciaux, n'en est pas moins complète. Dans la figure 17, la coupe intéresse toutes les cellules de cet hémisphère. D'après certains détails, comme la situation des noyaux dans les cellules-sœurs, l'existence de résidus fusoriaux encore très nets, la disposition radiaire des mitochondries dans certaines cellules, on peut conclure que la troisième division n'est pas écoulée depuis longtemps. La description de ces cellules se superpose à celle des cellules antérieures de la moitié végétative. Comme celles-ci, elles renferment trois zones: une zone externe renfermant le vitellus, une zone moyenne dépourvue d'éléments figurés, et une zone périnucléaire formée de mitochondries. J'attire l'attention sur la concordance entre la situation de cette zone et celle du plasma jaune de Conklin dans ces mêmes cellules.

Sur les stades ultérieurs, jusqu'à la gastrula, je n'ai pu faire que des observations fragmentaires, faute de matériel. J'ai pu constater pourtant, dans des embryons segmentés en 32 et 64 blastomères environ, l'abondance des mitochondries dans les cellules postérieures de l'hémisphère végétatif et la persistance dans les petites cellules médiales de la calotte de protoplasme brun foncé décrite tout-à-l'heure.

Des images extrêmement instructives me furent fournies par une portion d'embryons, fixés par le liquide de Benda 6 heures après l'addition de sperme. Ces embryons étaient arrivés au stade gastrula. J'en donne deux coupes, l'une transversale et passant par le blastopore encore ouvert (figure 18), l'autre sagittale et un peu latérale (figure 19).

La figure 18 nous montre quatre catégories de cellules présentant des caractères cytologiques différents. Les petites cellules qui recouvrent toute la surface de l'embryon, les cellules ectodermiques, renferment assez bien de vitellus et de chondriosomes: ceux-ci, grains ou petits bâtonnets, se trouvent surtout autour du noyau. Le plancher de la cavité est formé par deux grosses cellules appartenant à l'endoderme; ces cellules sont gorgées de vitellus; elles renferment en outre au voisinage du noyau quelques rares mitochondries et chondriocontes. En dehors de ces cellules, entre elles et l'ectoderme, se trouvent de chaque côté de la ligne médiane quelques cellules du mésenchyme; elles sont plus volumineuses que les cellules ectodermiques; elles renferment très peu de grains vitellins et assez bien de mitochondries et de chondriocontes répartis dans toute la cellule. Dans les préparations à la méthode de Benda, ces cellules frappent par leur aspect clair. Enfin, les lèvres du blastopore sont occupées par des cellules volumineuses, aplaties dans le sens dorso-ventral, remarquables par la quantité considérable de mitochondries qu'elles renferment: elles apparaissent toutes violettes dans les préparations. Ces cellules sont les cellules musculaires de Conklin, les cellules neuro-musculaires de Castle; je reviendrai brièvement tout-à-l'heure sur ce point.

Dans la coupe sagittale représentée figure 19, l'extrémité antérieure de la larve est tournée à droite. On y retrouve les cellules ectodermiques et endodermiques, à l'extrémité postérieure les cellules musculaires et un peu en avant de celles-ci, deux cellules mésenchymatiques simplement effleurées, avec les caractères cytologiques que je viens de décrire. Cette coupe montre en outre les cellules de la chorde et les cellules de la plaque médullaire.

Dans mes préparations, les cellules de la chorde ne se distinguent des cellules endodermiques que par un noyau moins volumineux. Les cellules nerveuses se distinguent nettement des cellules ectodermiques. Elles renferment moins de vitellus que celles-ci (à peu près autant, semble-t-il, que les cellules du mésenchyme), mais par contre beaucoup plus de chondriosomes (beaucoup plus aussi que les cellules du mésenchyme: aussi apparaissent-elles plus foncées que celles-ci). Les chondriosomes sont presque tous des grains, souvent disposés en chaînettes, rarement des bâtonnets; ils sont répandus dans toute la cellule.

Si l'on compare ces résultats à ceux de Conklin, on constate encore une fois des coïncidences remarquables. Comme Conklin, je constate des différences entre les cellules constituant les différents organes de la gastrula, sauf entre les cellules de la chorde et de l'endoderme.

En ce qui concerne maintenant l'origine de ces cellules et leur sort ultérieur, mes préparations, malgré l'insuffisance du matériel, permettent quelques constatations intéressantes. Les cellules musculaires dérivent, d'après Conklin, des cellules de la partie postérieure de l'hémisphère végétatif de l'embryon, qui ont reçu la plus grande partie de la substance du croissant jaune. Je constate de même dans mes préparations que certaines cellules de la gastrula sont, comme les cellules postérieures de l'hémisphère végétatif, extraordinairement riches en mitochondries. Dans la larve, comme nous le verrons plus loin, les cellules musculaires ont exactement les mêmes caractères. Que ces cellules musculaires dérivent des cellules de la moitié postérieure de l'hémisphère végétatif et soient de plus localisées, comme le veut Conklin, aux lèvres latérales et au bord postérieur du blastopore, est en parfaite concordance avec mes observations. Je suis ainsi amené à prendre position, pour Klaatsch et Conklin, contre Castle, dans la question de l'anneau neuro-musculaire.¹

Voici un autre point: D'après Conklin, les cellules du mésenchyme dérivent pour la plupart d'une souche commune avec les cellules musculaires, à la suite de divisions différentielles qui répartissent inégalement le plasme jaune. Or, les caractères cytologiques des cellules du mésenchyme, tels que je les observe dans mes préparations, concordent avec cette manière de voir. Car les cellules du mésenchyme renferment peu de vitellus, comme les cellules musculaires et comme leur souche commune présumée B5, 1 et 2. Elles renferment de plus peu de chondriosomes, ce qui peut effectivement être le résultat d'une répartition inégale de ces éléments.

Des divisions différentielles, je n'ai pu observer dans mon matériel que la seconde division de segmentation et celle de B4,1. Outre ces divisions et celle donnant naissance aux cellules mésenchymatiques, il doit encore se produire d'autres processus intéressants, car ils démontrent l'importance de la division du cytoplasme. Ainsi par exemple, la division donnant naissance aux cellules de la chorde et du système nerveux aux dépens des cellules neurochordales. Il doit y avoir à ce moment séparation presque complète entre les grains

¹J'ai déjà indiqué (1913) que l'étude des chondriosomes pourrait rendre des services dans des recherches sur la filiation des cellules, soit sur des préparations fixées, soit à l'aide d'une coloration vitale. En ce qui concerne ce dernier point, j'ai tout spécialement en vue le vert-jaune, proposé par Michaelis. Employé suivant la méthode de Bensley, ce colorant donne, comme mon ami, le docteur E. V. Cowdry a bien voulu me le montrer, des résultats remarquables.

A propos de coloration vitale, je ferai remarquer que, contrairement à ce que prétend Arnold (1914, p. 316), je n'ai jamais dit que les chondriosomes ne sont pas colorables *in vivo* (cf. Duesberg, 1912, p. 608); je pense à la vérité qu'ils ne se colorent pas *in vivo* par les méthodes d'Arnold.

vitellins, qui passent en majorité dans les cellules de la chorde, et les chondriosomes qui passent surtout dans les cellules nerveuses. Un phénomène analogue doit s'observer également dans la formation des cellules endodermiques, ainsi que des cellules ectodermiques et nerveuses de même souche.

Il me reste encore à décrire brièvement les larves que j'ai fixées et colorées par la méthode de Benda. La figure 20 représente une coupe d'une telle larve, intéressant la plupart des organes qui la constituent. Les cellules ectodermiques présentent les caractères qu'elles avaient dans la gastrula, et il en est de même des cellules endodermiques, délimitant la cavité intestinale. Les cellules du mésenchyme paraissent par contre plus riches en chondriosomes qu'elles ne l'étaient antérieurement. Dans les cellules formant l'épithélium du système nerveux, la proportion des chondriosomes paraît s'être maintenue, mais leur situation a changé: ils sont surtout localisés autour du noyau. Certaines de ces cellules présentent des caractères spéciaux, telle la cellule représentée figure 21, l'otolithe ou bouton pigmenté de Van Beneden et Julin (1884, 2).

Les cellules les plus remarquables par leur aspect sont les cellules musculaires, disposées en trois rangées de chaque côté de la ligne médiane, dans la queue de la larve. Elles apparaissent dans les préparations colorées par la méthode de Benda en violet foncé, par suite de la présence de nombreuses mitochondries: ce caractère, nous le trouvons déjà dans la gastrula. Dans une coupe longitudinale, comme dans la figure 20, on voit que ces cellules sont fortement allongées dans l'axe de la queue. Leur disposition caractéristique, en trois rangées de chaque côté de la chorde, est visible dans la figure 22, qui représente une coupe transversale de cet organe. La même coupe montre aussi, outre les cellules ectodermiques, les prolongements endodermique et nerveux et la cellule chordale axiale.

En examinant les cellules musculaires sur une coupe longitudinale, j'ai souvent été frappé par la disposition suivante (figure 20). Les mitochondries y sont, dans la couche superficielle, disposées en chaînettes. Me basant sur ce que j'ai observé chez le poulet (1910), j'ai émis l'hypothèse (1913) qu'ici aussi les chondriosomes forment les myofibrilles. J'ai tenté de compléter mon matériel, qui ne comportait que des stades trop jeunes; un envoi que M. le docteur Cerruti a eu l'obligeance de me faire, comportait malheureusement des stades trop avancés.

Je ne puis donc trancher la question et je compte y revenir. Mais je désire attirer dès maintenant l'attention sur deux points, qui me paraissent appuyer mon hypothèse. Le premier est celui-ci. En présence de la quantité de chondriosomes qui remplissent les cellules musculaires, on ne voit pas aux dépens de quel autre matériel pourraient se former les myofibrilles. En second lieu, c'est un fait bien connu que les myofibrilles sont placées dans les cellules musculaires des Ascidiens, à la périphérie de ces cellules. J'ai pu m'en assurer par moi-même pour *Ciona*, dans les larves reçues de Naples, et pour d'autres espèces grâce à des préparations obligeamment mises à ma disposition par M. Julin. Elles occupent par conséquent l'endroit où les mitochondries se disposent en chaînettes.

Je signale enfin qu'au cours de mes recherches, j'ai eu l'occasion de voir des fragments de tissus adultes, dans lesquels les chondriosomes étaient bien colorés. Déjà les frères Zoja ont donné une courte description des "plastidules" dans certains tissus de *Ciona*. Ils écrivent à propos des cellules intestinales:

Le cellule della mucosa hanno piccoli plastiduli tondeggianti accumulati alla base; seguono poi altri plastiduli in forma di lunghi e rigidi bastoncini lievemente ondulati, non abbondanti; il terzo più interno della cellula è occupato da tenuissimi filamenti contorti. Nel corpo della cellula si riconoscono inoltre forme rosse anulari, talora allungate, e sferette verdognole; sopra il nucleo è un amasso di plastiduli.

Ils signalent aussi des plastidules dans les cellules des ganglions nerveux, dans les corpuscules sanguins et dans les muscles.

J'ai observé dans les cellules intestinales une disposition analogue à celle décrite par les frères Zoja.¹ J'ai vu également des chondriosomes dans toutes les cellules libres, dans les cellules du manteau et dans les cellules de l'épithélium branchial.

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES RELATIVES À LA RÉPARTITION DES CHONDRIOSOMES PENDANT LA SEGMENTATION.

Je ne trouve dans la littérature antérieure à ma note de 1913 qu'une seule indication relative à une répartition inégale des chondriosomes au cours de la segmentation. Encore est-elle bien peu précise.

Ayant traité par sa méthode des embryons de triton, Benda (1900) constate que la quantité de "Mitochondria"

... erscheint in den verschiedenen Zellen sehr ungleichmässig. Die kleinen Zellen des animalen Poles enthalten bisweilen scheinbar viel reichere Mengen als die grösseren des vegetativen Poles, besonders im Ruhezustand; doch dürfte dieser Anschein durch eine dichtere Lagerung vorge-
täuscht werden (pages 166-167).

En 1913, Romeis émit l'avis que la quantité de mitochondries contenues dans les premiers blastomères de l'*Ascaris* n'est pas égale, mais plus grande dans les Somazellen. A en juger d'après les figures, cette différence est cependant peu marquée. De plus, Fauré-Frémiet (1913) décrit une répartition égale des mitochondries entre les deux premiers blastomères. Il admet pourtant que la cellule germinative P₄ en contient sensiblement moins.

Voilà à quoi se bornent à ma connaissance les données positives sur ce point. Pourtant, en parcourant la littérature, on trouve des indications qui font penser à des phénomènes analogues à ceux que j'ai observés chez *Ciona*: celles, par exemple, de Driesch (1896) sur *Myzostoma*. A priori, tous les œufs à développement en mosaïque paraîtraient devoir se comporter sous ce rapport comme l'œuf des Ascidiens: mais il ne faut cependant pas perdre de vue, comme je l'ai déjà fait remarquer (1913), la possibilité d'une répartition *qualitativement* inégale des chondriosomes, phénomène qui échappe à l'investigation microscopique.

Dans d'autres espèces animales, chez les Echinodermes, par exemple (Meves), la répartition des chondriosomes entre les blastomères se fait d'une manière en apparence égale. On remarquera qu'il s'agit, dans ce cas, d'un œuf doué de pouvoir régulateur.

MES OBSERVATIONS COMPARÉES À CELLES DE CONKLIN.

D'une façon générale, on peut dire que mes observations, abstraction faite de certains points qui ont été signalés au cours de ce travail, concordent avec celles de Conklin, parfois jusque dans de très petits détails. Je ne suis par contre pas d'accord avec lui sur l'interprétation des faits observés.

La thèse de Conklin est la suivante: Il existe dans l'œuf des Ascidiens une série de plasmes: myoplasme, ectoplasme, endoplasme, chordoneuroplasma. Chacun de ces plasmes est destiné à former un organe déterminé, représente au sens le plus strict une substance organogène.

Pour moi, ces différentes substances, telles que Conklin les conçoit, n'existent pas. *Les différents aspects des diverses régions de l'œuf et des blastomères dépendent, non pas de*

¹Dans l'épithélium stomachal, Hirschler (1914) ne signale que des grains peu nombreux.

l'existence de substances spéciales, mais d'une répartition spéciale des éléments figurés de l'ovoplasme. C'est ainsi que le myoplasme de Conklin n'est autre chose qu'une accumulation de mitochondries dans la région correspondante de l'œuf; dans le protoplasme gris, ce sont les grains vitellins qui sont particulièrement abondants; enfin le protoplasme clair est tout simplement le protoplasme fondamental de l'œuf, plus ou moins pauvre en éléments figurés. Tous les phénomènes ultérieurs s'expliquent de la même manière. Le protoplasme clair qui occupe le centre de l'œuf lors de la première division, le centre de l'hémisphère animal lors de la seconde, n'est autre chose que la zone dépourvue de chondriosomes et de grains vitellins que l'on observe constamment autour de la figure karyokinétique. Si, plus tard, les cellules ectodermiques et les cellules nerveuses apparaissent plus claires que les autres, cela tient à ce qu'elles renferment moins d'éléments figurés que celles-ci; et la légère différence de teinte qui existe entre elles est certainement due aux proportions différentes de chondriosomes et de grains vitellins que ces cellules renferment. De même, si les cellules de l'endoderme paraissent formées d'un plasmе spécial gris foncé, cela tient à ce qu'elles sont bourrées de grains vitellins. Une remarque analogue s'applique aux cellules musculaires, aux cellules du mésenchyme, etc.

Il résulte de là, à mon avis, que les différentes zones que l'on observe dans l'œuf des Ascidiens n'ont pas, abstraction faite sans doute du croissant postéro-dorsal, l'importance que Conklin leur attribue. Le phénomène important est celui de la division différentielle, répartissant inégalement, mais suivant certaines règles, les divers éléments de l'ovoplasme. La segmentation de l'œuf des Ascidiens nous montre que la division cytoplasmique est, comme le pense Rabl (1906), un phénomène important et très compliqué.¹ Tout le phénomène de la division cellulaire a pour résultat, comme le dit Conklin (1909), non seulement une répartition égale des chromosomes, mais encore "the localization and differential distribution of the ooplasmic substances to the daughter-cells" (p. 154).

¹Boveri (1914, 2) a émis l'hypothèse que la cellule cancéreuse est une cellule dans laquelle une division anormale a déterminé un "Defekt" chromosomique. Ce "Defekt," la cellule est incapable de le compenser, tandis qu'elle serait au contraire capable de compenser toute défectuosité cytoplasmique, "chaque partie du protoplasme renfermant les qualités du tout." Je considère cette dernière proposition comme tout-à-fait inexacte et je pense que l'on pourrait tout aussi bien, en se basant notamment sur les résultats de ce travail, admettre que la cellule cancéreuse est une cellule qu'une division anormale a privé d'un élément cytoplasmique important.

II. PARTIE THÉORIQUE.

CHONDRIOSOMES ET STRUCTURE DU PROTOPLASME.

Un premier point que je voudrais toucher dans ce paragraphe est celui de l'existence des chondriosomes dans la cellule vivante. Cela peut paraître inutile. Hausschild (1914) vient pourtant de publier un travail sur la glande de Harder des rongeurs, dans lequel il conclut formellement que les chondriosomes sont produits par les réactifs fixateurs. Il me suffira de montrer par un exemple le manque de méthode qui a présidé à l'exécution de ce travail, pour qu'il soit apprécié à sa juste valeur. Hausschild a essayé de colorer les chondriosomes *in vivo* et il n'a pas réussi. C'est un de ses arguments contre leur existence. Mais, quand on parcourt la liste des substances qu'il a employées, on s'aperçoit qu'il a précisément négligé de se servir des colorants recommandés et notamment du meilleur, du vert-janus.

D'autres remarques concernant l'existence des chondriosomes *in vivo* trouveront leur place un peu plus loin, à propos des observations de Retzius.

Une observation de Luna (1913) m'amène à dire quelques mots de la continuité des chondriosomes. Luna a étudié les chondriosomes dans le feuillet externe de la rétine de l'embryon de poulet. Il constate qu'ils se transforment en grains de pigment. En même temps, leur nombre diminue, à tel point que du huitième au seizième jour on n'en trouve plus. A partir du dix-septième jour, ils commencent à réapparaître, sous forme de grains ou de petits bâtonnets. Des chondriosomes pourraient par conséquent se former *de novo*.

Je puis confirmer que pendant une partie du développement du poulet, les chondriosomes sont très rares dans les cellules du feuillet externe de la rétine: affirmer qu'ils manquent complètement me paraît, en présence du nombre considérable de grains de pigment qui remplissent ces cellules, fort difficile. Mais fussent-ils même complètement absents, la réapparition d'éléments colorables par les méthodes des chondriosomes ne prouverait pas encore une formation de chondriosomes *de novo*.

D'abord, il faudrait montrer que ces éléments sont réellement des chondriosomes. Ensuite, les modifications subies par les chondriosomes se transformant en grains de pigment pourraient être réversibles. Précisément Busacca (1913) vient de conclure de ses recherches que les chondriosomes forment simplement le stroma sur lequel se dépose le pigment. Je rappelle que pour Altmann, les grains de pigment constituaient simplement une catégorie spéciale des bioblastes.

Enfin, je voudrais, à propos de cette question, faire la remarque suivante: Je suis partisan de la continuité des chondriosomes et mon opinion s'appuie sur de nombreuses observations, et principalement sur des observations relatives aux cellules sexuelles et aux cellules embryonnaires. Mais rien, théoriquement, ne me paraît s'opposer à ce que les chondriosomes disparaissent au cours de la vie d'une cellule pour réapparaître plus tard. Si les chondriosomes sont formés d'une substance colloïde, cette substance peut à un moment donné se disperser dans le milieu ambiant, et le phénomène inverse peut aussi se produire: c'est ainsi que Della Valle (1912) se représente la formation des chromosomes et leur disparition. J'ajoute cependant qu'aucun fait de ce genre ne me paraît établi.

Ces recherches m'amènent enfin à donner mon avis sur la structure du protoplasme et à discuter à ce propos la conception de Retzius. Pour Retzius, le protoplasme est formé de deux substances: le mitome et le paramitome. Le mitome est formé de microsomes

incorporés à de fins filaments, enrobés dans une substance hyaline et homogène, le paramitome. Cette conception, qui ne tient aucun compte des chondriosomes, est basée sur l'emploi de méthodes qui détruisent ces derniers. Tout récemment, Retzius s'est enfin décidé à appliquer à l'étude de la structure du protoplasme les méthodes recommandées pour la mise en évidence des chondriosomes, mais, comme il le reconnaît lui-même, sans succès. Il émet à leur sujet des opinions tout-à-fait fantaisistes: dans les leucocytes, il ne les trouve que chez des animaux affamés (1912)! Aussi maintient-il entièrement sa manière de voir.

Discuter ses observations dans les détails m'entraînerait trop loin. Je me borne à relever les points suivants:

Tout d'abord, je ne puis m'empêcher de trouver extraordinaire l'assurance de Retzius en présence des résultats purement négatifs de ses recherches, et je ne puis que regretter, avec Benda (1914), qu'il ne se soit pas décidé à étudier à fond les méthodes des chondriosomes ou, plus simplement, à se faire montrer quelques préparations.

De plus, la fidélité des méthodes de fixation et de coloration des chondriosomes est démontrée depuis longtemps par une série d'observations *in vivo*, dont Hauschild aurait également pu faire son profit. Elle vient d'être confirmée de la manière la plus nette par les récentes observations de M. R. et W. H. Lewis (1914, 1915), sur des cellules d'embryons de poulet, cultivées dans le liquide de Locke. Dans ces cellules, les chondriosomes sont visibles avec une netteté parfaite (un facteur important est sans doute la minceur de ces cellules). On y retrouve, comme les auteurs ont eu l'extrême obligeance de me le montrer, toutes les formes de chondriosomes que l'on observe dans les cellules fixées: grains, bâtonnets, longs filaments, boucles, etc. On y observe aussi leurs changements de situation, souvent accompagnés d'un changement de forme, pendant la mitose: à la métaphase, ils se disposent constamment autour du fuseau, à l'anaphase, on les trouve souvent entre les noyaux-filles, comme dans les préparations fixées.¹

Ces observations ont encore un autre intérêt: on s'est souvent demandé si la substance fondamentale du protoplasme a réellement une structure.

Lillie (1906), étudiant les mouvements des microsomes (qui sont probablement des mitochondries) dans l'œuf de *Chaetopterus*, considère le réseau protoplasmique comme un produit des réactifs.

Meves (1911) fait valoir que les mouvements des mitochondries mâles dans l'œuf de *Ascaris* sont incompatibles avec l'existence de filaments qui les réuniraient.

Mes propres observations sur les mitochondries de l'œuf des Ascidiens et sur les déplacements qu'elles subissent, m'amènent à une conclusion analogue.²

Or, M. R. et W. H. Lewis constatent que dans la cellule vivante, les chondriosomes changent continuellement leur forme et leur situation:

The mitochondria are almost never at rest, but are continually changing their position and also their shape. The changes in shape are truly remarkable, not only in the great variety of forms, but also in the rapidity with which they change from one form to another. A single mitochondrion may bend back and forth with a somewhat undulatory movement or thicken at one end and thin out at the other with an appearance almost like that of pulsation, repeating this process many times. Again, a single mitochondrion sometimes twists and turns rapidly as though attached at one end, like the lashing of a flagellum, then suddenly moves off to another position in the cytoplasm, as

¹Je mentionne également à ce propos une observation de Chambers (1914). Dans les cellules séminales de *Disostira*, examinées *in vivo*, Chambers décrit à l'anaphase une disposition des chondriosomes absolument analogue à celle décrite par Meves et Duesberg (1908) dans les spermatocytes de *Vespa crabro*, traités par la méthode de Benda.

²Les mitochondries peuvent aussi être déplacées par centrifugation (Browne, 1914). Ceci n'est cependant pas démonstratif, car la centrifugation pourrait détruire la structure du protoplasme.

though some tension had been released. Corresponding to the forms observed in the stained preparations we find in the living that granules can be seen to fuse together into rods and chains, and these to elongate into threads, which in turn anastomose with each other and may unite into a complicated network, which in turn may break down into threads, rods, loops and rings.

J'ai eu l'occasion d'observer ces mouvements. Ils me paraissent incompatibles avec l'existence du mitome de Retzius ou de filaments dans lesquels, comme le veut Benda (1914), les chondriosomes seraient incorporés.

CHONDRIOSOMES ET IDIOPLASME.

Benda, puis Meves, ont admis que la partie de l'idioplasme localisée dans le protoplasme¹ est représentée par les chondriosomes.

Les observations de Meves sur l'*Ascaris* (1911), confirmées par Held (1912), Romeis (1913) et Fauré-Frémiet (1913),² ont donné à cette théorie un sérieux appui et lui ont gagné de nombreux partisans: Van der Stricht, Lams, Russo, Levi, moi-même, etc. On trouvera des renseignements complets sur la littérature dans mon article critique, pages 830 et suivantes. Je me bornerai à rapporter ici quelques opinions récentes.

Broman (1911) admet sans réserves que les chondriosomes représentent "die protoplasmatische Vererbungssubstanz," mais formule l'hypothèse accessoire suivante:

Les chromosomes sont les porteurs des caractères héréditaires qui font la race et l'espèce, les chondriosomes sont les porteurs des caractères individuels. Broman voit dans la répartition strictement égale de la substance chromatique au cours des divisions de maturation et de segmentation, "eine Schutzmassregel um die Art- und Rasseigenschaften konstant zu erhalten." La répartition moins rigoureusement égale des chondriosomes est "ein Mittel zur individuellen Variation." Les différences qui peuvent se produire dans la réduction quantitative des chondriosomes mâles et femelles (celles-ci se réduisant par transformation en vitellus) et les différences qui en résultent dans la valeur proportionnelle des gamètes sont un autre facteur de cette variation.

A la suite de considérations sur les éléments porteurs de caractères héréditaires, Wilson (1914) écrit:

Genetic experiment has already given some ground for the conclusion that definite types of hereditary distribution may be immediately dependent upon elements contained in the protoplasm. Recent advances in our knowledge of the "chondriosomes" or "plastosomes" provide this conclusion with at least a possible cytological basis (page 352).

Je signale enfin des expériences de Boveri (1914, 1) qui, malgré l'opinion contraire de leur auteur, ne peuvent être invoquées contre la théorie de Meves.

Boveri prend des œufs de *Sphærechinus* et les fragmente les uns avant, les autres après la fécondation par du sperme de *Strongylocentrotus*. Les larves issues des premiers ne présentent pas plus de caractères paternels que les secondes. Ces caractères ne sont donc pas influencés proportionnellement à la quantité de protoplasme maternel; "à moins," ajoute Boveri, "que la substance protoplasmique héréditaire ne soit pas répandue uniformément dans l'œuf, mais soit par exemple localisée au voisinage des noyaux: ce qui n'est pas vraisemblable." Or, rien n'autorise Boveri à supposer que les mitochondries ne soient pas plus abondantes au voisinage du noyau que dans le restant de l'œuf.

¹Et non tout l'idioplasme comme le prétend à tort Goldschmidt (1913).

²Il me paraît inutile de discuter les observations de Vojdovski (1912) et de Retzius (1911, 1) sur le même objet, car elles ont été faites à l'aide de méthodes impropres à la conservation des chondriosomes, et leurs conclusions sont par conséquent sans valeur. La même remarque s'applique à une observation de Montgomery (1912) sur l'absence de chondriosomes dans le spermatozoïde de *Peripatus* et à une observation analogue de Vojdovski (1912) sur *Diastramena*. Je me rallie d'ailleurs, dans les points essentiels, à la critique que Meves (1913) a faite de ces travaux.

En faveur de la théorie de Meves, on peut aussi invoquer les observations antérieures de Van der Stricht et de Lams (cf. Duesberg, 1912), celles de Meves sur les Echinodermes (1912) et sur *Phallusia* (1913) et les miennes sur *Ciona*. Cependant, déjà au moment où Meves publiait ses recherches sur l'*Ascaris*, une objection pouvait lui être faite. Van der Stricht en effet avait trouvé que chez la chauve-souris, la pièce intermédiaire du spermatozoïde passe tout entière dans l'un des blastomères, et Lams constata la même chose chez le cobaye. Plus tard Meves (1912) fit une observation analogue sur les Echinodermes. Enfin, Levi (1914) vient, chez la chauve-souris, de retrouver la queue du spermatozoïde dans un des petits blastomères de l'œuf segmenté en trois.

Pour tourner cette difficulté, Van der Stricht et Henneguy avaient admis (voir Comptes-rendus de l'Association des anatomistes, 1910) que seul le blastomère renfermant la queue du spermatozoïde formerait l'embryon, l'autre formant le trophoblaste. L'observation de Levi ne contredit pas cette hypothèse: car, d'après Sobotta (1914), la différenciation en ébauche embryonnaire et trophoblastique ne se fait qu'au stade quatre, un seul des quatre premiers blastomères formant l'embryon. Meves appliqua cette explication à l'œuf d'oursin et admit que seul le blastomère renfermant le "Mittelstück" est employé à former l'animal définitif. Mais voici que Meves lui-même (1914) renverse son hypothèse: car, poursuivant le "Mittelstück" jusque dans la blastula, il le retrouve, tantôt dans des cellules du pôle animal, tantôt dans des cellules du pôle végétatif!

Que conclure? Faut-il abandonner complètement l'hypothèse d'un rôle des chondriosomes dans l'hérédité? Ne pourrait-on peut-être attribuer ce rôle exclusivement aux chondriosomes de l'œuf qui sont certainement "hérités" par toutes les cellules de l'embryon? Cette dernière hypothèse m'amène à dire quelques mots de l'hypothèse de l'équivalence des gamètes, considérée par certains auteurs, et notamment par O. Hertwig, comme un dogme.

Alette Schreiner (1912) n'admet pas que l'œuf et le spermatozoïde soient équivalents. Il lui paraît superflu que des caractères identiques soient représentés dans chaque gamète. Elle se figure que les caractères généraux de l'espèce, communs aux deux copulants, sont transmis par le protoplasme de l'œuf, tandis que les caractères spéciaux de chaque individu sont représentés par ses chromosomes.¹ On remarquera que Broman, qui admet aussi une inéquivalence des gamètes, attribue au noyau le rôle opposé.

Jenkinson (1914) a émis une opinion qui présente avec la précédente une certaine ressemblance. Il admet que le protoplasme transmet certains caractères héréditaires:

Those which give the organism its rough outline, the large feature which place it in its proper phylum . . . and such general characters are probably transmitted only by the cytoplasm and, therefore, only by the female cell . . . The smaller characters of course—generic, specific, varietals— . . . are obviously transmitted equally by the germ-cells of the two sexes; that is, are carried by the chromosomes or smaller chromatic elements of the nuclei (p. 152).

Je ferai aussi remarquer que l'inéquivalence des noyaux des gamètes est démontrée par les recherches sur les chromosomes accessoires.

Personnellement, l'attribution de la valeur d'éléments idioplasmiques aux seuls chondriosomes de l'œuf me paraît, contrairement à l'opinion que j'avais en 1912, une hypothèse assez séduisante. Mais je ne sais alors quel rôle attribuer aux chondriosomes du spermatozoïde. Je ne puis, d'une part, m'expliquer l'optimisme de Meves (1914), qui pense "immer noch an die Möglichkeit denken zu dürfen, dass das Mittelstück in die sogenannte 'Seeigelanlage' oder 'Seeigelscheibe' übergeht (p. 7)." D'autre part, je ne puis oublier

¹A. Schreiner ne rejette d'ailleurs pas l'hypothèse d'un rôle des chondriosomes du spermatozoïde, "qui paraissent avoir un homologue dans l'œuf."

certaines faits qui ne trouvent jusqu'ici leur explication que dans l'hypothèse de la valeur idioplasmique des chondriosomes du spermatozoïde: leur constance, l'élimination de la substance fondamentale du protoplasme au cours de la spermiogenèse, l'absence de toute autre explication satisfaisante (cf. Duesberg, 1912), enfin, leur sort chez certaines espèces, comme l'*Ascaris*, au cours des phénomènes de la fécondation. De nouvelles recherches me paraissent vivement désirables.

CHONDRIOSOMES ET SUBSTANCES ORGANOGÈNES.

Les données de l'embryologie expérimentale démontrent que dans certains œufs, les ébauches des organes de l'embryon sont localisées en des points déterminés du cytoplasme. Je me borne à rappeler les expériences de Crampton (1896), de Fischel (1897, 1898), de Wilson (1904), de Conklin (1905, 3, 1911), de Brachet (1905), etc.

Mes observations sur la répartition des chondriosomes dans l'œuf et l'embryon des Ascidiens donnent à ces expériences une base cytologique, en montrant que les diverses parties de l'œuf et les divers blastomères peuvent présenter, suivant leur destination, des différences histologiquement appréciables.

Ces données sont en opposition formelle avec la théorie de la "Biogenesis" de O. Hertwig. Pour cet auteur, toutes les cellules qui dérivent de l'œuf ont au début la même valeur. Leur différenciation est le résultat, non pas d'une autodifférenciation, mais de l'influence qu'exercent sur chaque cellule ses voisines et le milieu ambiant.

O. Hertwig ne donne cependant pas¹ d'explication satisfaisante des données relatives à l'existence de localisations germinales. Ses tentatives d'explication, y compris celles basées sur les expériences de centrifugation et de compression d'œufs, reposent en réalité sur une hypothèse qui n'est pas conforme aux résultats de l'embryologie expérimentale: la localisation exclusive de l'idioplasme dans le noyau. Il est un point, par contre, sur lequel je suis d'accord avec lui: sur sa critique de l'expression "substances organogènes." Hertwig fait remarquer avec raison que seules les cellules forment des organes. Si je continue à employer cette expression, c'est faute d'en connaître une meilleure.

Les chondriosomes représentent-ils ces substances organogènes?

Avec Meves (1908), je suis tenté d'admettre qu'une des différences entre les œufs à mosaïque et les œufs doués d'un pouvoir régulateur réside dans la différenciation plus ou moins précoce de leurs chondriosomes. Je pense que dans *Ciona*, par exemple, les chondriosomes qui occupent le croissant possèdent des qualités différentes de celles des autres chondriosomes de l'œuf, tandis que chez les Echinodermes, des différenciations analogues ne se produisent que plus tard.

Soit dit, en passant, l'opinion que je viens d'émettre n'implique nullement que les chondriosomes représentent le substratum de toutes les différenciations ultérieures. Il suffit d'admettre que les chondriosomes des diverses cellules de l'adulte ne sont pas identiques entre eux, ce qui implique un certain degré de différenciation au cours du développement.

J'en reviens à la question posée: les chondriosomes représentent-ils les substances organogènes? Ma réponse est négative. Toutes les modifications que subissent les chondriosomes sont intimement liées à des modifications de la substance fondamentale qui les entoure. L'expression de "substance organogène" ne peut s'appliquer qu'au complexe formé par ces deux éléments.

¹Pas plus que Greil (1912).

Avant de terminer, je crois devoir donner mon avis sur des expériences de centrifugation d'œufs: ces expériences démontreraient que les éléments figurés de l'œuf, et par conséquent les chondriosomes, ne sont pas organo-formateurs. C'est la conclusion que Fauré-Frémiet (1913) tire des expériences de Boveri et Hogue (1909) sur l'œuf d'*Ascaris*.

Abstraction faite de ceci, que dans ce cas spécial, il reste certainement des mitochondries dans l'œuf centrifugé d'*Ascaris*¹ (cf. les figures de Boveri, 1910), il me paraît, d'une façon toute générale, que ces expériences mériteraient d'être refaites en appliquant à l'étude des matériaux les méthodes mettant en évidence les chondriosomes.

Ceci m'amène à parler des observations de C. J. Beckwith (1914), qui a employé ces méthodes. Cet auteur soumet des œufs d'*Hydractinia echinata*, fécondés depuis 5 minutes, à la centrifugation. Les œufs deviennent piriformes et les matériaux s'y répartissent en trois couches: une couche d'huile, une zone claire et une zone renfermant les mitochondries et le vitellus. Si on laisse ces œufs se développer, on constate que le premier plan de segmentation répartit les matériaux d'une manière quelconque. Il se forme néanmoins des planulas en apparence normales, dans lesquelles vitellus et mitochondries d'une part, huile d'autre part, sont localisés en des points différents.

Mlle. Beckwith a aussi séparé les deux premiers blastomères d'œufs centrifugés. Un petit nombre formèrent des planulas. Certaines ne contenaient aucune mitochondrie et paraissaient normales: les mitochondries ne sont donc pas indispensables à la différenciation, tout au moins jusqu'à ce stade.

Je ferai tout d'abord remarquer que ces expériences ne démontrent pas que les chondriosomes ne jouent aucun rôle dans la différenciation des tissus, puisqu'elles ne dépassent pas un stade où aucun tissu n'est encore différencié. De plus, je me permets de me demander si Mlle. Beckwith a réellement suivi les chondriosomes à tous les stades: et voici pourquoi: Mlle. Beckwith ne trouve pas de mitochondries dans les premiers stades de l'ovogenèse: elles n'apparaissent que quand le vitellus "is well formed." Elles se forment, conclut-elle, *de novo* dans le protoplasme. Cette assertion ne manquera pas de surprendre tous ceux qui ont étudié les chondriosomes au cours de l'ovogenèse. Elle est de plus en contradiction avec d'autres observations sur un animal appartenant à la même classe, celles de Tsukaguchi (1914) sur *Aurelia aurita*. Cet auteur nous montre, dans les ovogonies et dans les ovocytes de tous âges, des chondriosomes typiques, électivement colorés par la méthode d'Altmann.

BALTIMORE, Mars 1915.

¹Si tant est que les granulations éliminées au cours de la centrifugation soient bien les mitochondries.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

- ARNOLD, J. 1914. Ueber Plasmastrukturen und ihre funktionelle Bedeutung. Fischer, Jena.
- BALLOWITZ, E. 1894. Bemerkungen zu der Arbeit von Dr. phil. Karl Ballowitz über die Spermkörper der Arthropoden, nebst weiteren spermatologischen Beiträgen, betreffend die Tunicaten, Mollusken, Würmer, Echinodermen und Coelenteraten. Internat. Monatschr. für Anat. und Phys., Bd. XI.
- BECKWITH, C. J. 1914. The genesis of the plasma-structure in the egg of *Hydractinia echinata*. Journ. Morph., vol. 25.
- BENDA, C. 1900. Weitere Beobachtungen über die Mitochondria und ihr Verhältnis zu Sekretgranulationen, nebst kritischen Bemerkungen. Verh. der Phys. Gesellsch. Berlin.
- 1903. Die Mitochondria. Ergebnisse der Anat. und Entwickl., Bd. 12.
- 1914. Die Bedeutung der Zelleibstruktur für die Pathologie. Verh. der deutschen Path. Gesellsch. München.
- BLUNTSCHLI, H. 1904. Beobachtungen am Ovarial der Monascidie *Cynthia microcosmus*. Morph. Jahrb., Bd. 32.
- BOVERI, TH. 1890. Ueber das Verhalten der chromatischen Kernsubstanz bei der Bildung der Richtungskörper und bei der Befruchtung. Jenaische Zeitschr., Bd. 24.
- 1910. Ueber die Teilung centrifugierter Eier von *Ascaris megalcephala*. Arch. für Entwicklungsmech., Bd. 30.
- 1914. 1. Ueber die Charaktere von Echiniden-Bastardlarven bei verschiedenem Mengenverhältnis mütterlicher und väterlicher Substanzen. Verh. der Phys.-Med. Gesellsch. zu Würzburg, n. F., Bd. XLIII.
- 1914. 2. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Fischer, Jena.
- BOVERI, TH., und HOGUE, M. 1909. Ueber die Möglichkeit, *Ascaris* Eier zur Teilung in zwei gleichwertige Blastomeren zu veranlassen. Sitz.-Ber. der Phys.-Med. Gesellsch. zu Würzburg.
- BRACHET, A. 1905. Recherches expérimentales sur l'œuf de *Rana fusca*. Archives de Biologie, vol. 21.
- BROMAN, I. 1911. Normale und abnorme Entwicklung des Menschen. J. F. Bergmann, Wiesbaden.
- BROWNE, E. N. 1914. The effects of centrifuging the spermatoocyte cells of *Notonecta*, with special reference to the mitochondria. Journ. of Exper. Zoology, vol. 17.
- BUSACCA, ARCH. 1913. Sulla genesi del pigmento corioideo. Ric. del Lab. di Anat. norm. della R. Univ. di Roma, vol. XVII.
- CASTLE, W. E. 1896. The early embryology of *Ciona intestinalis*, Flemming (L.). Bull. Mus. Comp. Zool., Harvard College, Vol. 27.
- CHAMBERS, R., JR. 1915. Micro-dissection studies on the germ-cell. Science, vol. XLI.
- CONKLIN, E. G. 1905. (1). The organization and cell-lineage of the Ascidian egg. Journ. Acad. Nat. Sci. Phila., 2d ser., vol. XIII.
- 1905. (2). Organ-forming substances in the eggs of the Ascidians. Biol. Bull., vol. VIII.
- 1905. (3). Mosaic development in Ascidian eggs. Journ. Exper. Zool., vol. 2.
- 1906. Does half of an Ascidian egg give rise to a whole larva? Arch. für Entw. Mech., Bd. 21.
- 1909. The application of experiment to the study of the organization and early differentiation of the egg. The Anat. Record, vol. 3.
- 1911. The organization of the egg and the development of single blastomeres of *Phallusia mamillata*. Journ. Exper. Zool., vol. X.
- COWDRY, E. V. 1914. The comparative distribution of mitochondria in spinal ganglion cells of vertebrate. Am. Journ. Anat., vol. 17.
- CRAMPTON, H. E. 1896. Experimental studies on gasteropod development, with an appendix of E. B. Wilson. Arch. für Entw.-Mech., Bd. 3.
- DELLA VALLE, P. 1912. La morfologia della cromatina dal punto di vista fisico. Arch. Zoologico italiano, vol. 6.
- DRIESCH, H. 1896. Betrachtungen über die Organisation des Eies und ihre Genese. Arch. für Entw.-Mech., Bd. 4.
- DUESBERG, J. 1910. Les chondriosomes des cellules embryonnaires du poulet et leur rôle dans la genèse des myofibrilles, avec quelques observations sur le développement des fibres musculaires striées. Arch. für Zellf., Bd. 4.
- 1912. Plastosomen, "Apparato reticolare interno" und Chromidialapparat. Ergeb. der Anat. und Entw., Bd. 20.
- 1913. Plastosomes et "substances organogènes" dans l'œuf des Ascidien. Bull. de l'Acad. des Sciences de Belgique (voir aussi: Verh. der anat. Gesellsch., Greifswald, 1913).
- 1914. Trophospongien und Golgischer Binnenapparat. Verh. der anat. Gesellsch. Innsbruck.
- FAURÉ-FRÉMIET, E. 1913. Le cycle germinatif de l'*Ascaris megalcephala*. Arch. d'Anat. mier., vol. 15.
- FISCHEL, A. 1897 et 1898. Experimentelle Untersuchungen am Ctenophorencel. Arch. für Entw. Mech., Bd. 6 et 7.
- GOLDSCHMIDT, R. 1913. Die Vererbung und Bestimmung des Geschlechtes. Vortrag gehalten in der 84ten Versammlung deutscher Naturforscher und Aerzte. Münster, 1912.
- GOLSKI, ST. 1899. Reifung und Befruchtung des Eies von *Ciona intestinalis* Fl. Bull. de l'Acad. des Sc. de Cracovie.
- GREIL, A. 1912. Richtlinien des Entwicklungs- und Vererbungsproblem. Beiträge zur allgemeinen Physiologie der Entwicklung. Zool. Jahr., Bd. 31. Abt. für allg. Zool. und Phys.
- GUTHERZ, S. 1904. Selbst- und Kreuzbefruchtung bei solitären Ascidien. Arch. für mikr. Anat., Bd. 64.
- HAUSSCHILD, M. W. 1914. Zellstruktur und Sekretion in den Orbitaldrüsen der Nager. Ein Beitrag zur Lehre von den geformten Protoplasmaegebilden. Anat. Hefte, Bd. 50.
- HELD, II. 1912. Ueber den Vorgang der Befruchtung bei *Ascaris megalcephala*. Verh. der anat. Gesellsch. München.
- HERTWIG, O. 1909. Allgemeine Biologie. Fischer, Jena.
- HIRSCHLER, J. 1914. Ueber Plasmastrukturen (Golgischer Apparat, Mitochondrien, u. a.), in den Tunicaten-, Spongien-, und Protozoenzellen. Anat. Anz., Bd. 47.
- HOGUE, M. 1910. Ueber die Wirkung der Centrifugalkraft auf die Eier von *Ascaris megalcephala*. Arch. für Entw. Mech., Bd. 29.
- JENKINSON, J. W. 1914. On the relation between the structure and the development of the centrifuged egg of the frog. Quart. Journ. Micr. Science, vol. 60.
- JULIN, CH. 1893. Structure et développement des glandes sexuelles; ovogenèse, spermatogenèse et fécondation chez *Styelopsis grossularia*. Bull. sc. de la France et de la Belgique.
- KLAATSCH, H. 1897. Bemerkungen über die Gastrula des *Amphioxus*. Morph. Jahrb., Bd. 25.
- LEVI, G. 1914. Das Verhalten der Chondriosomen bei den frühesten Entwicklungsstadien der Säugetiere. Verh. der anat. Gesellsch. Innsbruck.

- LEWIS, M. R. AND W. H. 1914. Mitochondria in tissue-culture. *Science*, n. s., vol. XXXIX.
- 1915. Mitochondria (and other cytoplasmic structures) in tissue-cultures. *Amer. Journ. Anat.*, vol. 17.
- LILLIE, F. R. 1906. Observations and experiments concerning the elementary phenomena of embryonic development in *Chatopterus*. *Journ. Exper. Zool.*, vol. 3.
- LOYEZ, M. 1909. Les premiers stades de la vitellogenèse chez quelques Tuniciers. *C. R. Assoc. Anat. Nancy*.
- LUNA, E. 1913. Nuove ricerche sulla biologia del condrioma. (Condriosomi e pigmento retinico.) *Nota preventiva*. *Anat. Anz.*, Bd. 43.
- MEVES, FR. 1908. Die Chondriosomen als Träger erblicher Anlagen. *Cytologische Studien am Hühnerembryo*. *Arch. für mikr. Anat.*, Bd. 72.
- 1911. Ueber die Beteiligung der Plastochondrien an der Befruchtung des Eies von *Ascaris megalocephala*. *Arch. für mikr. Anat.*, Bd. 76.
- 1912. Verfolgung des sogenannten Mittelstückes des Echinidenspermiums bis zum Ende der ersten Furchungsteilung. *Arch. für mikr. Anat.*, Bd. 80.
- 1913. Ueber das Verhalten des plastomatischen Bestandteiles des Spermiums bei der Befruchtung des Eies von *Phallusia mamillata*. *Arch. für mikr. Anat.*, Bd. 82.
- 1914. Verfolgung des Mittelstückes des Echinidenspermiums durch die ersten Zellgenerationen des befruchteten Eies. *Arch. für mikr. Anat.*, Bd. 85.
- MEVES, FR., et DUESNERG, J. 1908. Die Spermatocyten-teilungen bei der Hornisse (*Vespa crabro* L.). *Arch. für mikr. Anat.*, Bd. 71.
- MONTGOMERY, TH. 1912. Complete discharge of mitochondria from the spermatozoon of *Peripatus*. *Biol. Bull.*, vol. 22.
- PICTET, C. 1891. Recherches sur la spermatogenèse chez quelques invertébrés de la Méditerranée. *Mitt. aus der zool. Station zu Neapel*, Bd. 10.
- RABL, C. 1906. Ueber "organbildende Substanzen" und ihre Bedeutung für die Vererbung. *Engelmann, Leipzig*.
- REGAUD, CL. 1910. Etude sur la structure des tubes séminifères et sur la spermatogenèse chez les Mammifères. *Arch. d'Anat. micr.*, vol. 11.
- RETZIUS, G. 1904. Zur Kenntnis der Spermien der Evertibraten. I. 6. Die Spermien der Tunicaten. *Biol. Unters.*, n. F., Bd. XI.
- RETZIUS, G., 1911. (1) Untersuchungen über den Bau und die Entwicklung der Eier von *Ascaris megalocephala* in der Periode vor und nach dem Befruchtungsakt, und mit besonderer Berücksichtigung des Verhaltens der Chromosomen zur Ehrlich-Biondi Färbung. *Biol. Unters.*, n. F., Bd. 16.
- 1911. (2) Untersuchungen an Eiern von verschiedenen Wirbellosen und Wirbeltieren. A. Die Eier von *Ascidia intestinalis* L. (*Ciona canina* O. F. Müller). *Ibid.*
- 1912. Zur Frage von dem Problem von der Protoplasmastruktur. *Biol. Unters.*, n. F., Bd. 17.
- ROMEIS, B. 1913. Beobachtungen über die Plastosomen von *Ascaris megalocephala* während der Embryonalentwicklung, unter besonderer Berücksichtigung ihres Verhaltens in den Stamm- und Urgeschlechtszellen. *Arch. für mikr. Anat.*, Bd. 81.
- RUBASCHKIN, W. 1910. Chondriosomen und Differenzierungsprozesse bei Säugetierembryonen. *Anat. Hefte*, Bd. 41.
- SCHAXEL, J. 1911. Plasmastrukturen, Chondriosomen und Chromidien. *Anat. Anz.*, Bd. 39.
- SCHREINER, A. 1912. Kurze Bemerkung zur Frage von der Bedeutung des Kerns und des Zelleibs als Erbllichkeitsträger. *Biol. Centralbl.*, Bd. 32.
- SOBOTTA, J. 1914. Eineiige Zwillinge und Doppelmissbildungen des Menschen im Lichte neuerer Forschungsergebnisse der Säugetierembryologie. *Studien zur Pathologie der Entwicklung*. Bd. 1.
- TSUKAUCHI, R. 1914. Ueber die feinere Struktur des Ovarialeies von *Aurelia aurita* L. *Arch. für mikr. Anat.*, Bd. 85.
- VAN BENEDEN, ED. et JULIN, CH. 1884, 1. La segmentation chez les Ascidiens et ses rapports avec l'organisation de la larve. *Archives de Biologie*, vol. 5.
- 1884, 2. Le système nerveux central des Ascidiens adultes et ses rapports avec celui des larves urodèles. *Ibid.*
- 1887. Recherches sur la morphologie des Tuniciers. *Arch. de Biologie*, vol. 6.
- VEJDOVSKI, F. 1912. Zum Problem der Vererbungsträger. *Prag, Verlag der K. Böhm. Gesellsch. der Wiss.*
- WILSON, E. B. 1904. Experimental studies on germinal localization. *Journ. Exper. Zool.*, vol. 1.
- 1914. The bearing of cytological research on heredity. *Proc. Roy. Soc. Biol. Sciences*, vol. 88.
- ZOJA, L. e R. 1891. Intorno ai plastiduli fucino-fili (bioplasti dell' Altmann). *Mem. Ist. lomb. sc. lett. Milano*, vol. 16.

EXPLICATION DES PLANCHES.

Toutes les figures ont été faites à l'aide de l'appareil à dessiner d'Abbé. Eclairage à la lumière artificielle (bec Auer).
Projection à la hauteur de la platine du microscope.

PLANCHE I.

FIGURES 1 à 6: spermatogenèse. Méthode de Benda. Imm. 1, 5; oc. 18.

Figure 1: groupe de spermatogonies.

Figure 2: spermatocyte de premier ordre.

Figure 3: jeune spermatide.

Figures 4, 5 et 6: trois stades de la transformation de la spermatide en spermatozoïde. Une partie de la queue seulement est représentée.

FIGURE 7. Méthode de Benda. Imm. 2 mm., oc. 4. Œuf d'une portion fixée 10 minutes après l'addition de sperme. Le spermatozoïde n'est pas visible sur cette coupe. Cellules du testa.

FIGURE 8. Méthode d'Altmann, mordantage d'après Rubaschkin (1910). Imm. 1, 5; oc. 12. Œuf fixé après 10 minutes. Spermatozoïde entier dans l'œuf. Chondriosomes et grains vitellins en rouge.

FIGURE 9. Méthode de Benda. Imm. 1, 5; oc. 12. Œuf fixé après 5 minutes. Chondriosomes en violet, chromatine et grains vitellins en brun. Coupe transversale de la tête du spermatozoïde.

FIGURE 10. Liquide de Flemming, hématoxyline ferrique. Imm. 1, 5; oc. 12. Œuf fixé après 10 minutes. Spermatozoïde entier dans l'œuf. La tête est déjà nettement plus gonflée que dans les deux figures précédentes.

PLANCHE II.

FIGURE 11. Méthode de Benda. Imm. 1, 5; oc. 6. Œuf fixé après 20 minutes. Tête du spermatozoïde dans la zone mitochondriale.

FIGURE 12. Méthode de Benda. Imm. 2 mm., oc. 4. Œuf fixé après 30 minutes. Pronucleus mâle et fin de la seconde division de maturation.

FIGURE 13. Méthode de Benda. Imm. 2 mm., oc. 4. Œuf fixé après 45 minutes. Les deux pronuclei au voisinage du croissant mitochondrial. La trainée spermatique est complétée dans cette figure d'après la coupe suivante du même œuf.

FIGURE 14. Méthode de Benda. Imm. 2 mm., oc. 4. Œuf fixé après 60 minutes. Première division de segmentation. Dans la zone mitochondriale, la trainée spermatique.

FIGURE 15. Méthode de Benda. Imm. 2 mm., oc. 4. Œuf fixé après 1 heure 20. Seconde division.

PLANCHE III.

FIGURE 16. Méthode de Benda. Imm. 2 mm., oc. 4. Œuf fixé après 2 h. 10, et segmenté en 16 blastomères. La coupe intéresse les huit blastomères du pôle végétatif, dont les quatre postérieurs (en bas) sont particulièrement riches en mitochondries.

FIGURE 17. Méthode de Benda. Imm. 2 mm., oc. 4. Même stade. La coupe intéresse les huit blastomères du pôle animal.

FIGURE 18. Méthode de Benda. Imm. 2 mm., oc. 4. Œuf fixé après 6 heures. Gastrula. Coupe transversale passant par le blastopore.

FIGURE 19. Méthode de Benda. Même grossissement et même stade. Coupe sagittale (le dos en bas, l'extrémité postérieure à gauche).

FIGURE 20. Méthode de Benda. Imm. 2 mm., oc. 4. Larve fixée après 19 heures. A gauche, la coupe de la queue, intéressée tangentiellement au niveau des cellules musculaires. A droite, le corps de la larve. Cellules du testa.

FIGURE 21. Méthode de Benda. Imm. 2 mm., oc. 12. Cellules du système nerveux et otolithe.

FIGURE 22. Méthode de Benda. Imm. 2 mm., oc. 6. Larve fixée après 19 h. Coupe transversale de la queue.



FIG. 2

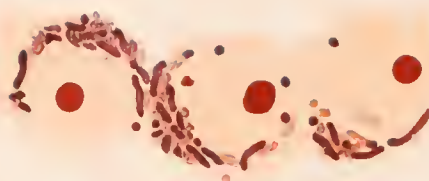


FIG. 1



FIG. 3



FIG. 4

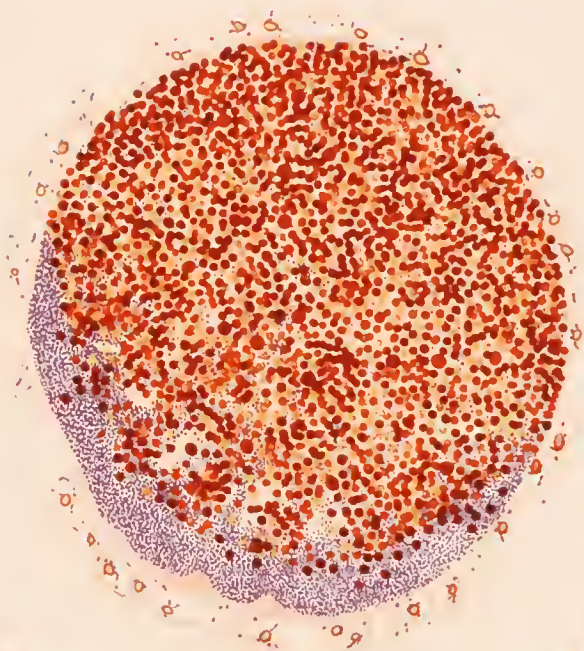


FIG. 7



FIG. 6



FIG. 5

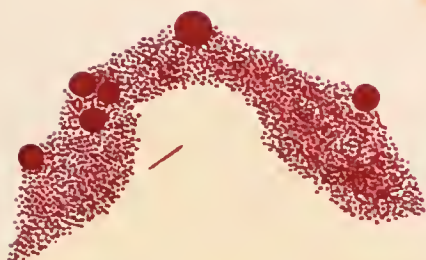


FIG. 8

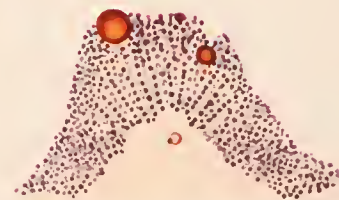


FIG. 9

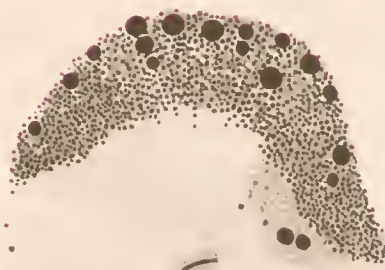


FIG. 10

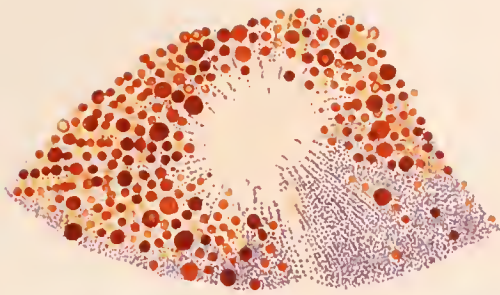


FIG. 11

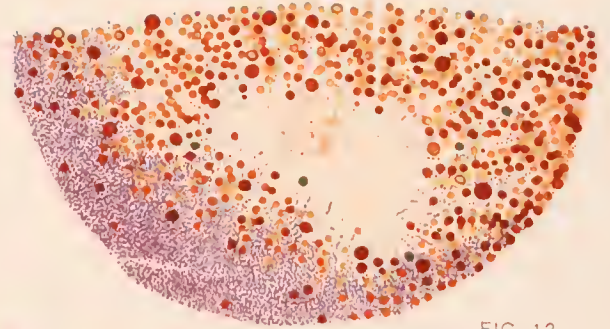


FIG. 13

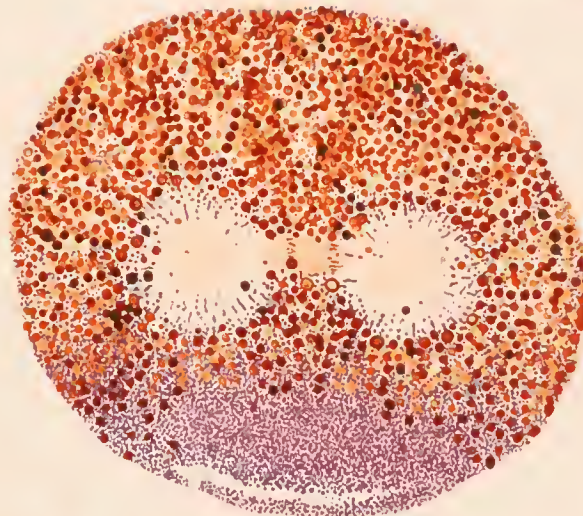


FIG. 14

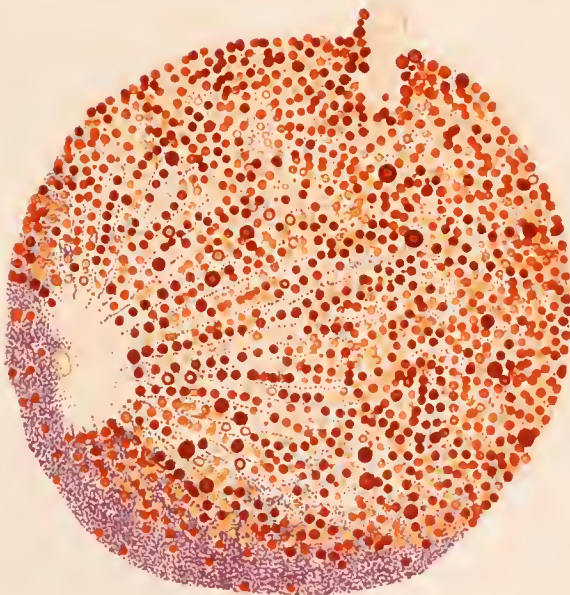


FIG. 12

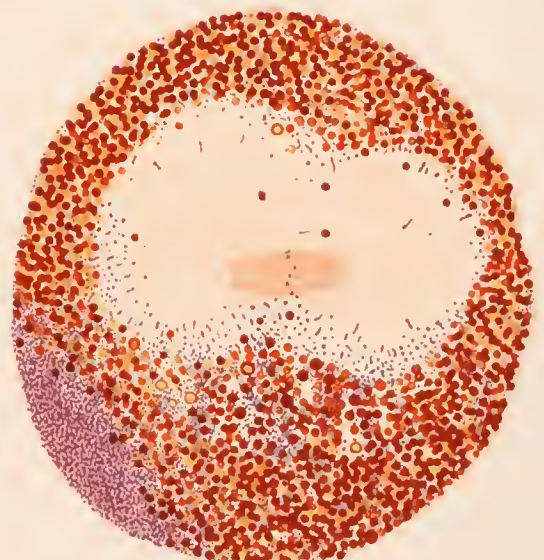


FIG. 15

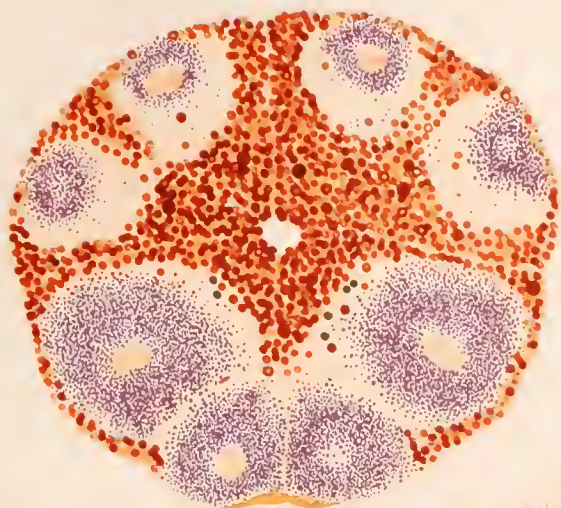


FIG. 16



FIG. 17

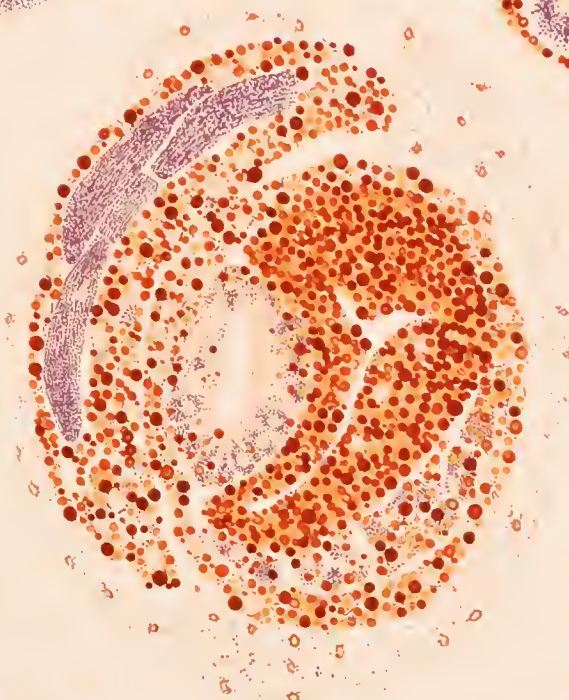


FIG. 20



FIG. 21

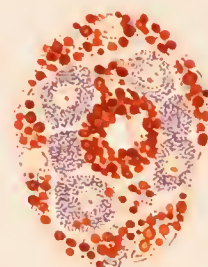


FIG. 22

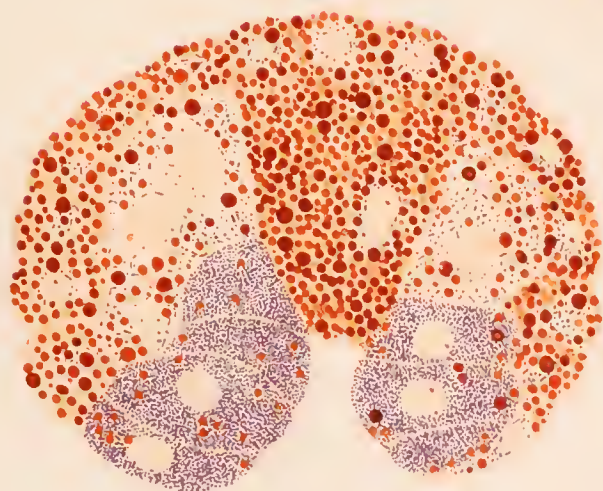


FIG. 18

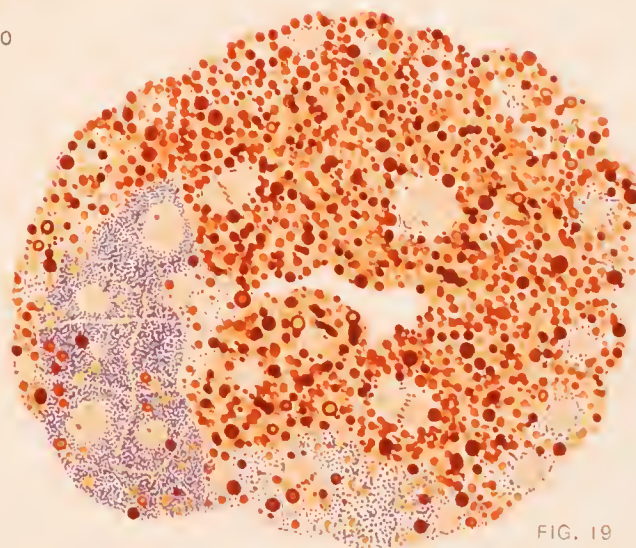


FIG. 19

CONTRIBUTIONS TO EMBRYOLOGY, NO. 9.

THE HISTOLOGY OF THE POISON-GLANDS OF BUFO AGUA
AND ITS BEARING UPON THE FORMATION OF
EPINEPHRIN WITHIN THE GLANDS.

By P. G. SHIPLEY AND G. B. WISLOCKI.

With two plates.

THE HISTOLOGY OF THE POISON-GLANDS OF BUFO AGUA AND ITS BEARING UPON THE FORMATION OF EPINEPHRIN WITHIN THE GLANDS.

BY P. G. SHIPLEY AND G. B. WISLOCKI.

INTRODUCTION.

During the autumn of 1910, considerable interest was aroused in the pharmacological laboratories of the Johns Hopkins University by the milky secretion from the "parotid glands" of the toads which were being used in an experimental study of the convulsant action of certain organic dye-stuffs. Attention was first called to the peculiar character of the secretion by the appearance of a bluish-green discoloration on knife-blades which had come in contact with it; and the secretion being found to give the characteristic green color of the pyrocatechin reaction when dilute solutions of it were treated with ferrie chloride, it was subjected to a thorough chemical and pharmacological study with the object of ascertaining the composition of the poison.

The results of this investigation were published by Abel and Macht (Abel and Macht, 1912) in the *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, after a preliminary report which appeared in the *Journal of the American Medical Association* (Abel and Macht, 1911). They found that besides a highly volatile, odoriferous substance, which they were unable to isolate, and a crystalline compound belonging, pharmacologically speaking, to the digitalis group, which they called "bufagin," the crude venom contained about 7 per cent of another crystalline body which on isolation and analysis was shown to be dihydroxy-methyl-amino-ethylol-benzene ($C_6H_3(OH)_2CHOH.CH_2NHCH_3$) or epinephrin (adrenalin).

That the epinephrin occurring in these glands is identical in every way with that substance as obtained from the suprarenal capsules was abundantly demonstrated by the polarimetric, chemical, and physiological reactions of the crude venom and the pure crystalline substance and (as will be shown later) the chromaffin reaction in microscopic secretions serves to strengthen an identity already well established.

These interesting findings naturally call for careful histological study of the poison glands with special reference to the epinephrin content of the secretion.

Several basic problems in connection with the venom and the structures in which it is produced and stored at once suggest themselves for investigation. Is the epinephrin produced in the poison-gland; and, if so, where and how? If the compound is formed elsewhere than in the gland, what is the mechanism of its production and secretion? How do the necessity for and the consequent synthesis by the organism of so great a quantity of adrenalin affect the usual chromaffin organs—adrenal, sympathetic system, etc.? Supposing epinephrin to be produced by the gland-cells themselves, what is the embryological history of the gland and how does it happen that cells which originate from the epidermis are capable of producing a substance supposedly characteristic of other and more highly differentiated structures?

This particular study was undertaken with the idea of establishing the presence of chromaffin material in the venom and the gland parenchyma, to investigate histologically

the mechanism of its synthesis, and to determine the distribution of chromaffin cells in other tissues throughout the animal's body and their relation to the production and storage of the epinephrin content of the crude venom.

The results, while throwing some light on certain of these questions, leave others still in darkness, and a great deal more must be done by the embryologist and biochemist before the mechanism of venom secretion and elaboration in these interesting glands can be at all fully understood and the discussion of their physiology regarded as closed.

MATERIAL AND METHODS.

Since the purpose of this communication was only to describe the various depots of chromaffin tissue and material, almost all the tissue studied was fixed in a modified Orth's solution of the following composition:

3.5 per cent aqueous solution of potassium bichromate.....	90 c.c.
40 per cent formalin.....	10 c.c.

A large number of stains were used alone and in combination: hematoxylin and eosin, iron hematoxylin, Weigert's elastic tissue stain, Mallory's stain for connective tissue, and hematoxylin counterstained with Van Gieson's mixture. The sections of the poison-glands, adrenal, and sympathetic ganglia were made with the ordinary celloidin technique. Tissue prepared for the study of fat was fixed in 5 per cent and 10 per cent solutions of formalin, and cut in thin sections with a freezing microtome after careful washing in distilled water. These frozen sections stained with hematoxylin and counterstained with alkaline Sudan III were found very useful (fig. 10) in studying the relations of the adrenal cortex to the medulla of that organ.

Eviscerated animals were stuffed with cotton soaked in formol bichromate, and after being carefully wrapped in linen were packed in an ice-chest for 24 hours to determine the gross anatomical distribution of the various chromaffin organs.

Besides the "parotid gland," pieces of the dorsal skin, kidney, adrenal, testis, and sympathetic ganglia were prepared and sectioned. All of our material was obtained from healthy adult animals brought to Baltimore from the region about Montego Bay, Jamaica, British West Indies.

It is a pleasure to express here our gratitude to Professor John J. Abel, of the Department of Pharmacology, who very kindly gave us the toads which we have studied and whose advice and assistance have been of great value in the preparation of this paper. We wish to thank also Mrs. F. R. Schultz for the drawings with which this paper is illustrated, and we are indebted to Mr. Hurd, of the Anatomy Department, for the photomicrographic illustrations. We wish here to acknowledge our obligation to him.

We have also had the privilege of examining some sections of the poison-glands of this same toad which were made by Dr. E. B. Wood, while a student here in 1911-12. These sections, which we found very useful in confirming some of our findings, were presented by him to the Johns Hopkins University and are now in the demonstration collection of the Department of Anatomy.

GENERAL.

*Bufo agua*¹ (*horridus*, *maculiventris*, *marinus*, *humeralis*, *ornatus*, *ictericus*, *lazarus*, *Rana marina*, *Bombinator horridus*, *Neotles*, *Pseudobufo*, and *Doecidophryne agua*), on which these studies were made, is a huge tropical toad inhabiting some of the West Indies, South and Central America, and part of Mexico. It is the largest of the Anura, measuring about 11.5 cm. from nose-tip to the end of the urostyle and having a maximum breadth of 4.5 cm. when not inflated. The toad exhibits on the back and sides large numbers of warts or buried masses of subcutaneous glands which reach their maximum development along the mid-dorsal region. The dorsal surface of the limbs and the upper eyelid are also warty, the protuberances on the hind limbs being much more prominent than those of the anterior extremities. These warts have been shown to result from the collection, beneath the epidermis, of masses of cutaneous glands, which, lying as they do over a comparatively unimpressible substratum of bone, muscle, tendon, and cartilage, cause in the comparatively loose skin the swellings and depressions which give it its general unevenness of contour.

The skin of the toad is a deep muddy brown color on the dorsum, with an underlying reddish tone over the snout, jaws, and parotid region. There are no definite blotches of pigmentation, but the warts and bony prominences have a lighter color than the level skin about them. In general, the ventral surface is very light gray or white, the color-change from the brown of the dorsal skin occurring along a line made by the junction of the ventral and lateral surfaces of the animal when it is squatting on the ground. The coloring of the toad follows the general rules of protective coloring for animals of its species and harmonizes with its usual earthy backgrounds when viewed from above. On the ventral surface only a few very tiny warts are visible to the naked eye beneath the jaw, but the ventral skin seems marked out into areas like paving-blocks by small, fine wrinkles. The ventral surface is mottled all over with irregular patches of gray-brown pigment which are largest between the limbs and which become confluent near the junction of the belly with the lateral surface of the animal, forming a zone of solid gray-brown. The ventral surfaces of the hands and feet, which are chocolate brown in color, show numerous reddish warts which may reach 0.5 cm. in diameter.

By far the most noticeable of the projections on the animal's body are the huge warty masses formed by the acini of the "parotid" (figs. 1, 2, and 3) poison-glands. These large warts, which are roughly oval in shape, begin just behind the eye and, surrounding the upper border of the tympanum, pass backward and outward well down over the shoulders. The skin over these glands is somewhat lighter in color than that covering the surrounding tissues and shows, even to the naked eye, the numerous pinhole-like openings of the individual gland-ducts (fig. 1). From these ducts, if pressure be applied over them, or if the animal be sufficiently stimulated electrically or by other means, an abundant thick milky secretion spurts, which is extremely poisonous to animals with whose mucous membranes it comes in contact. The position and prominence of these "parotids," long known as poison-glands, make them very effective for the service which nature intended they should render. Thus, when the toad is seized in the mouth of an animal which would prey upon it, the contents of the poison-glands flow freely on to the animal's oral mucous membrane. The effect of such a charge of venom is almost immediate and the discomfort induced by its exhibition insures the prompt release of the toad.

¹The name *Bufo agua* was used by Abel and Macht in their description of the gland secretion and, in order to identify these histological studies with the physiological ones preceding them, we will throughout this paper use the same name without regard for zoological fitness.

THE PAROTID SECRETION.

The secretion or venom of these large parotid glands is a thick, milky-looking liquid which leaves a peculiar dirty bluish-green stain on steel with which it comes in contact, *viz*, on razor-blades used in preparing the glandular material previous to fixation. When dried in the air, the venom forms yellowish scales and we can confirm with enthusiasm the statements of Abel and Macht in regard to the bitterness of the taste of an emulsion of the dried secretion. When ferric chloride is added to a diluted emulsion of the venom the green color of a positive pyrocatechin reaction rapidly appears which turns pink after exposure to the air. Such an emulsion reduces Fehling's solution and gives a red color on treatment with ammonia.

Microscopically, the venom appears to be a liquid in which many small globules are suspended, floating freely about. They are insoluble in acetic acid, chloroform, and ether. These globules or droplets in the crude venom are usually discrete, but are sometimes crowded together in masses. They are the so-called "poison grains," which all authors who have worked with glands of this type believed to be or to contain the toxic principle of the gland secretion.

Abel and Macht have described the physiological effects of emulsions of venom and the epinephrin obtained from them on animals, and we do not propose to repeat an account of them here. It is sufficient to say the secretion contains true epinephrin, which is physiologically, chemically, and polarimetrically identical with that compound obtained in its purest form directly from the adrenal gland. Besides this there is present the digitalis-like bufagin and certain aromatic principles, which give to the venom its characteristic and unpleasant odor. In histological sections of material fixed in formol bichromate, the crude secretion has the yellow color of chromaffin substance.

Abel and Macht conclude that the secretory function of the glands is under the control of the central nervous system, "as their secretion is discharged in consequence of peripheral irritation of sufficient strength." (Abel and Macht, 1912, p. 324.)

Seeck (1891) believed that the expulsion of the secretion was the result of the contraction of the muscles of the skin, but Muhse (1909) has shown definitely that this is not the case, having demonstrated that smooth muscle-fibers do not exist in the skin and that the expulsive act is due to a contraction of the smooth muscle-fibers in the wall of the gland-acinus, and that it occurs in such a way as to force the secretion nearest to the duct to the skin surface first (Muhse, 1909, pp. 344-345). She has noticed also that the secretion is present in the glands in two forms which may be discharged separately on the skin surface. In the outer part of the gland she found a comparatively clear or finely punctate liquid, while in the gland center the secretion was very granular from the presence of coarse globules or "poison grains." Artificial stimulation of the skin, of sufficient strength to cause a discharge of venom, results in the appearance on the skin surface of the clear homogeneous liquid, which is the first of the gland secretion to be ejected. If the stimulation is continued the creamy granular secretion from the center of the poison-gland is expelled and spreads about over the thin fluid first discharged. The flow of creamy secretion continues until the gland-sac is emptied.

Muhse seems to regard the transparent liquid as a vehicle for the conveyance of the "poison grains" which spread about on the skin surface in the thinner fluid first secreted, believing this dilution of granular fluid would, of course, permit the "poison grains" more easy access to all parts of a hostile oral mucous membrane. We will speak further of these two sorts of secretion when describing the poison-gland, since we believe that our work has

shown that this homogeneous liquid is not merely a diluting fluid, but the most virulent poison the toad excretes.

Enough is known of the physical and toxicologic properties of this parotid secretion to make it plain how deadly and effective a defensive weapon it would be against an animal which had seized upon the toad as a prey. The nauseous bitter taste of the crude secretion and the immediate and intense salivation which follows the contact of even the smallest amount of it with an unprotected oral mucous membrane would insure the immediate release of the toad from an enemy's grip. Nor is this all, for should the venom come in contact with the mucosa of an empty stomach, violent retching and vomiting results. "0.1 gm. in a capsule given by mouth to a fasting dog weighing 5.8 kg., was followed in 10 minutes by the emesis of a clear bile-stained fluid, containing most of the poison; vomiting followed for 20 minutes." (Abel and Macht, *loc. cit.*, p. 326.)

Even more deadly is the result of an intra-venous exhibition of the venom. Abel and Macht (p. 326) say: "Injected intravenously into a large cat a quantity of the emulsion containing less than 0.020 gram of the crude dried venom induced a tremendous rise of blood-pressure, followed immediately by a fall, due to a sudden and complete standstill of the heart."

The speed and the deadly effect of the toad venom have long been known to some of the South American Indians, who have used the secretion as a poison to coat the tips of darts and arrows.

THE SKIN.

Before describing the histology of the poison-glands themselves, in order that their structure and relations may be understood, a short description of the epidermis from which they arise and the cutis vera in which they are embedded is necessary.

THE EPIDERMIS.

In celloidin sections it may be seen that the epidermis is composed of a stratified squamous epithelium, having from 4 to 8 layers of living cells (figs. 4 to 7). The layer nearest the cutis vera seems to compose the stratum germinativum and in this layer the cells are high-columnar in form. The cell-body gradually flattens as the higher strata are reached and the nuclei of the cells in the higher layers become larger and less chromatic, with a fine-threaded open-meshed network, in contrast to the small dark-staining nuclei of the germinating stratum. Some of the cells in the transitional layers have in their cytoplasm a few scattered granules of pigments, probably eleidin, and fine protoplasmic spines or prickles show very clearly. After the cells pass through the transitional stage the nuclei are lost from the cytoplasm and the epithelium becomes the lifeless molt which is periodically cast off by the toad.

The thickness of the epidermis is very variable throughout the body, but in the parotid region there is a noticeable thickening about the poison-gland orifices. These thickenings, which are due both to an hypertrophy of the individual epithelial cells and an increase in their number, show in sections as little epithelial mounds or hillocks on either side of the duct opening, midway between it and the mouth of the next duct. From these little mounds the epidermis slopes gradually, becoming thinner as it descends to dip suddenly into the mouth of the gland-duct, the abrupt descent into the duct-lumen being usually marked, as Muhse has stated, by a second thickening of the epidermis. The small "mucous" glands cause no disturbance in the epithelium.

At frequent intervals one-celled glands, the so-called beaker-cells, may be found, which are entirely in the epidermis. They are very small and are seen between the

cells of the stratified epithelium. The slender necks of these bottle-shaped cells open on the surface which separates the transition layers of the epidermis from the molt, in whose separation they probably aid.

THE CUTIS VERA.

This layer is divided by Muhse into three zones—the outer loose, the compact, and the inner loose strata. This division is very plainly marked in the particular form of toad which we are at present considering. The outer loose zone is a very narrow layer of tissue, just beneath the stratum germinativum of the epidermis. It is very cellular and contains the youngest stages of the skin glands (figs. 2, 3, 4, 5, 6, and 7).

Mrs. Muhse's description of this layer is as exact for *Bufo aqua* as for the toads which she studied. She says, after describing the formation of the outer loose layer from fibers of the compact zone and the ascending bundles of the inner loose stratum:

"In either case the fibers are very loosely arranged in a network. Fibers from the outer loose layer terminate on the side toward the epidermis in numerous fine branches. This gives the appearance of a very thin homogeneous stratum, which for the most part follows intimately the lower border of the epidermis." (Muhse, *loc. cit.*, p. 330.)

In the innermost part of this layer lie the corial melanophores (figs. 4, 5, 6, and 7). These are branched cells whose cytoplasm is so heavily loaded with melanotic pigment that in most cases it is impossible to see the nucleus. These cells, as Hooker (1914) has shown in *Rana*, are amœboid and lie in the preformed spaces in the connective tissue, which spaces force upon the cell a constant form.

The compact stratum (figs. 3 to 7) of the cutis in *Bufo aqua* is remarkable in several ways. It consists of very compact bundles which, running mostly in a horizontal direction, form a thick mat seven or eight times the width of the outer loose stratum. So compact and closely woven are these bundles that they give to the stratum compactum the appearance of an almost homogeneous mass. It is a tissue in which cellular elements are almost absent. The bundles of this compact layer show a peculiar affinity for basic dyes, so that in sections stained with hematoxylin and eosin the entire layer is colored dark blue (fig. 7). In sections stained by Mallory's technique for connective tissue the bundles are deeply colored by the aniline-blue content of the stain. The stratum compactum is broken into bundles by narrow bands of connective-tissue fibers which, passing through it, unite the outer and inner loose layers of the corium.

Some of the mucous glands of the skin and the batteries of very young poison-glands are found embedded in this layer and it is perforated at intervals by the ducts of the mature poison-glands. Surrounding these ducts there is always found a sheath of loose tissue, which has been dragged down from the outer loose corial layer during the downward growth of the gland from the epidermis. In this layer of tissue the blood-vessels ascend which supply the gland-ducts, the outer loose stratum of the corium, and the epidermis.

The inner loose stratum of the corium (fig. 3) is the widest of all the corial strata and contains the oldest batteries of glands. On careful examination this layer may be divided into two distinct regions. About the gland acini and ducts the supporting tissue consists of fine, loosely interwoven fibers and is very cellular (figs. 3, 4, 5, and 7). It seems to be a continuation of the outer loose layer, with which it is identical in structure. A zone of this tissue, having a width of about half the diameter of the gland acinus, is found about the gland. This zone contains the numerous blood-vessels which are going to the gland acinus itself.

Just beneath the compact stratum the inner loose layer is formed of a wide layer of horizontally running bundles, arranged in sheets at right angles with each other, and beneath the glands and the loose connective tissue about them is another narrow layer constructed in an identical fashion. These two layers are connected by vertical bundles of fibers (figs. 3 and 7), so that each mature gland and its immediately surrounding connective tissue lies, as it were, in one of the cells of a honeycomb-like structure formed of dense bundles of connective tissue. There are many elastic fibers scattered through this tissue and in it are found numerous blood-vessels which supply the cutaneous glands, cutis vera, and epidermis.

From the inner loose layer numerous slender bundles of fine fibers pass outward to the outer loose layer through the compact stratum, which they divide into irregular bundles.

When this work was begun there was no thought of studying the vessels or nerves of the skin glands and the material was not prepared for such a study, but it may be seen from sections that the blood-supply is very abundant. In the lowest layer of the inner loose stratum are numerous large vessels, probably forming a coarse horizontal plexus at that level. From this plexus vertical branches, *vase recti*, pass upward in the loose tissue immediately about the glands, along the ascending bundles of connective tissue, and give off in their ascent horizontal branches from which the blood-supply to the gland is derived. These branches break up to form a very dense capillary network about the gland acinus in the loose connective tissue immediately touching the gland. Some branches are given off directly to supply the gland from the main plexus beneath the gland acini. A second plexus occurs in the outer layers of loose tissue just beneath the corial melanophores from which the blood-supply of the epidermis is derived. The connective tissue also contains many nerve bundles.

Scattered about in the lowest depths of the inner loose stratum of the corium are tiny groups of corial melanophores whose presence accounts for the black flecking which is apparent on the silvery undersurface of the skin when flaps of it are turned back and stripped off from the body.

THE POISON-GLANDS.

Since the poison-glands of these toads and the histo-chemical reactions which they exhibit are of major interest in this work, a brief discussion of the literature concerning them may be appropriate here. Investigators who have studied the cutaneous glands of the Batrachians differ among themselves as to whether these structures are all of the same nature or whether a classification is possible on a morphological or physiological basis.

Calmels (1838) and others have supported the theory that but one sort of gland is found in these animals. Muhse is an ardent advocate of this idea. Indeed, her entire paper has as a purpose the establishment of this theory on a firm basis. On the other hand, many authors believe that glands of two or even four sorts exist. The criteria for such differentiation are usually morphological, but, as in the case of Bristol and Bartelmez (1908) and Esterly (1904), who speak of poison and mucous glands, difference in secretion has been used by many authors as a basis for classification. Physiological activity, there can be no question, affords a firmer, more secure basis for classifying anatomical structures than a mere morphologic peculiarity, which often results from the technique used in handling the material studied, and we believe that this work has given, as we shall show later, added evidence for the separation of the cutaneous glands of at least one species of toad into mucous and poison varieties.

While the literature on these skin glands of various batrachians is fairly extensive, Bristol and Bartelmez are apparently the only authors who have dealt with the toad at present under consideration. In a short note in "Science," they say:

"The poison glands are found only on the upper surface of the body, while the mucous glands are found all over the skin and are crowded together in large parotid 'glands' behind each ear. They are much larger than the mucous glands and extend deep down into the compact corium layers. They are surrounded by a thin layer of loose connective tissue, which contains nerve fibers and a dense network of capillaries. There is an almost continuous layer of smooth muscle fibers about the gland. The cells of the glandular epithelium develop to an enormous size, and when mature they disintegrate, their entire plasma becoming the secretion, so that when a poison gland has reached its full development it is simply a reservoir of poison. When the poison is discharged the remains of the gland are resorbed and at the same time one of the five or six undeveloped glands, grouped around the mouth of the functioning gland, grows down alongside the remains of the discharged gland, pushing it aside to occupy its former place."

THE GLANDS.

The parenchyma of the parotid and other skin glands is buried deep in the cutis vera (figs. 2, 3, 5, and 7), so that if the skin in the parotid region is stripped off the gland comes away in the skin flap. When such a cutaneo-glandular flap is everted the tremendously rich nerve and blood supply to the gland is very striking. Huge arteries and veins come to and leave the gland-bearing region from the brachial vessels, accompanied in their course by nerves which supply the gland.

The under surface of the skin flap is silvery white in color and is thrown into deep hollows and ridges by the huge batteries of the gland above. In the region beneath the gland, numbers of corial melanophores fleck the silver background with a tiny irregular gray-black mottling.

If these glands are cut through with a razor—a matter somewhat difficult of accomplishment, since the skin of the animal is extremely tough and the glands discharge very readily on the lightest pressure after removal from the body—if these glands are cut through without emptying the batteries, the latter may be seen outlined against the surrounding connective tissue of the corium as dark yellowish gray sacks, not unlike a Chianti flask in shape, the flask's neck being represented by the ducts of the gland.

We have spoken of the toughness of the skin of the toad, and not without reason. So tough it is that the preparation of frozen sections from it, without loss of the glandular secretion, is impossible, and even by the use of the celloidin or paraffin methods of embedding the retention of the glandular content intact in thin sections is a matter of great difficulty. We have found the celloidin technique the most satisfactory for our purpose.

The poison-gland can be, as Muhse stated, divided into neck, collar, and acinus, and is, developmentally, a part or downgrowth of the epidermis.

Each mature adult gland of these toads can be seen in section to have its duct encircled by a ring of young glands, six or eight in number.

The mature glands (figs. 2 and 7) extend deep down into the inner loose layer of the corium and when fully developed reach an immense size. Usually longer than their breadth, they may be perfectly round or somewhat flattened from above (epidermalward) downwards. The largest acini which we have seen had an average length or depth of 3 millimeters and an average breadth of 2 millimeters. The wall of the gland is formed of an homogeneous matrix, in which is embedded a thick layer of spindle-shaped cells, which layer surrounds the entire gland (fig. 8). Most authors who have written on the subject of batrachian poison-glands are united in considering the spindle cells to be fibers of non-

striated muscle, but some, misled by their appearance in cross-section, have described them as the mother cells of the gland epithelium (Seeck, 1891; Weiss, 1898). They have been correctly described by Seeck, but he distinctly states that they are non-muscular.

Resting upon the matrix which supports the muscular coat, one finds the remains of the cells which once formed the secreting epithelium of the gland which exists in the adult stages only as nuclei (fig. 6) that are apparently uncovered by any cell cytoplasm. There is by no means a continuous layer of these nuclei; instead, they are assembled in groups, often with wide intervening spaces between them. These nuclei, which are probably held in place by the remains of a cell membrane, are large round or flattened masses which in the very oldest glands, as in the younger acini, show a definite irregular chromatin network with one or two large chromatic masses.

The collar of the gland is a cone-shaped mass of cells which rests with its base over the opening of the gland acinus. It has a lumen continuous with the lumen of the duct, which is in most cases not patent except during the expulsion of the venom. The collar is the final point of attachment of the muscular layer of the gland-wall. From it the fibers run downward, in a spiral manner, over the upper part of the gland acinus. Since the collar is solid it forms an ideal fixed point for the muscular layer when it contracts to expel the secretion. Muhse has described for this collar a radiating structure and in the toads which she examined has found both collar and duct to be built of an outer and an inner zone of cells (fig. 6), continuous respectively with the transitional and the molt strata, the dead cells of the latter reaching a depth approximately level with the lower surface of the epidermis. In *Bufo aqua* this layer of dead cells goes much lower and may reach down the duct for a depth of 200 or 300 micra. Each zone in these toads is composed of several layers of cells.

The ultimate attachment of the muscle coat surrounding the gland acinus is, as Muhse describes it, a point arbitrarily selected as the dividing line between collar and duct, at which the cells assume a "cog-wheel" structure, cells of the outer zone being arranged in groups radiating from the ring of inner zone cells. The muscle fibers in the gland matrix are intimately mixed with these radiating groups of cells, from which attachment they run downward and slant about the gland acinus in such a manner that their contraction opens the duct lumen, which is closed at the lower part of the neck. Further contraction, of course, compresses the body of the gland and squeezes it empty of secretion.

The gland duct or neck is cylindrical in form (figs. 4 and 7) and continuous with the cells of the gland collar, retaining the two radial zones up to its junction with the epidermis. The narrow lumen, which is not uniformly patent under normal conditions, but whose walls may touch one another, opens into a deep and wide pit or foveola, plainly visible to the naked eye on the skin surface. The lumen becomes narrower as we go down the duct until the junction of the duct with the collar is reached, where it is entirely closed. It may be patent throughout the collar, but is usually closed partly or entirely in this part of the gland. If it is patent in this region, the lumen is very tiny and it is always found closed at the opening of the acinus.

Careful inspection of our sections has led us to disagree with Mrs. Muhse's opinion that the cells of the epidermal stratum germinativum have no connection with the duct epithelium after the formation of the gland-bud. We have been able to trace the germinal layer in an unbroken line down the length of the duct into the collar and are forced to the conclusion that all three layers are represented in the gland-duct, at least in this particular variety of toads. We agree with Seeck, who states that the stratum germinativum is continuous throughout the gland-duct.

The acinus of the mature gland is, in good preparations, found entirely full of the poison which is the toad's means of defense against attacks of an enemy. In the mature gland acinus one can see that the undischarged poison is of two sorts, which occupy definite and different positions in the lumen of the acinus. This is especially evident in glands which have just reached the mature stage. In the center of the acinus the great mass of the secretion is granular and contains numerous globular bodies, sometimes gathered into masses, the so-called "poison grains." About the walls of the gland acinus, however, is a layer of material, very different in character, which has a perfectly homogeneous appearance, always distinct and easily seen, no matter how old the mature gland. Such layers of gland-content differ not only in appearance, but are also chemically distinct. In sections of material fixed in Orth's or Cohn's fluid, or like mixtures, the chromaffin reaction occurs in the homogeneous layer. In other words, the epinephrin content of the toad venom is in the clear homogeneous liquid part of the gland "secretion," which is found lying next the gland-wall.

If we examine the wall of the mature poison-gland, having epinephrin in its lumen, with the higher powers of the microscope, we see a very curious picture. We have said above that the epinephrin is found about the periphery of the gland acinus. Such an examination discloses the fact that the secretion is not walled off by the matrix which bounds the cavity of the sac, but that the homogeneous epinephrin-containing fluid extends out into the muscular layer surrounding the gland, filling in the spaces between the muscle-fibers and running between them in all directions, like an injection mass. This probably is the result of pressure unavoidably exerted on the glands when preparing them for fixation, since the same appearance may be seen, though not in as great a degree, in glands recently discharged by normal contraction of the muscular layer of the gland-wall. It is an interesting comment on the nature of the matrix in which the cells of the muscular layer are embedded, showing as it does that the matrix probably exists in life as a gel which allows free change in shape of the muscle-fibers during contraction. In contraction during the normal expulsive act, the swelling of the muscle-fibers and their compression into a smaller space probably result in the formation of a firm wall which prevents backing up of the fluid in the gland under pressure.

As the gland grows older, unused after reaching maturity, diffusion takes place and the whole content of the gland becomes infiltrated with the chromate-reducing epinephrin-containing liquid, so that after treatment with chromate mixtures the entire gland-content has a yellow stain, but the liquid layer is always distinguishable by its clear, homogeneous appearance and by its more intense chromaffin reaction.

The significance of this may be readily understood when we consider the physiology of the expulsion of the glandular secretion when the toad is stimulated in any way, *e. g.*, by seizure by an enemy. Contraction of the muscular layer about the gland causes first a dilatation of the duct lumen and an opening of the acinus. This preliminary dilatation is probably due to the contraction of the muscles about the gland-collar and the adjacent portion of the acinus. Immediately following the dilatation of the duct, or coincident with it, strong contraction of the muscles encircling the entire acinus empties the duct completely. The very thick, compact corial layer probably serves as a support about the duct, preventing its dilating under the strain of the pressure exerted by the strongly contracting muscles, so that the original size of the duct lumen is retained throughout. Thus the liquid gland secretion may spurt in a jet onto the oral mucous membrane of the animal which has seized the toad. When considerable pressure is applied to the glands, the secretion may be shot or

squirting out for some distance. If, for example, the glands are squeezed with large hysterectomy forceps, the venom will spurt out and cling to the sides of a glass bowl held over the animal, where it may be collected. We have not seen such spurting under mechanical stimuli, but Budgett states that if the toad be roughly handled, the parotids discharge like squirts.

Muhse has noted that the first discharge on stimulation is the clear homogeneous liquid from the outer parts of the gland acini. If the stimulus is continued, the clear liquid is followed by the typical milky secretion of the gland which flows about in the clear fluid and ultimately mixes with it. She believes this clear liquid to be a sort of vehicle which dilutes the more viscid fluid containing the poison grains and so permits the free diffusion and spread of the venom on the surfaces with which it comes in contact. In common with most authors, she evidently believes the poisonous principle of the venom to reside in the so-called poison grains, of which she says: "The granules of the mature secretion are known to have an irritating or poisonous effect on the mucous membranes of other animals." This may be the case, since we are not prepared to say whereabouts in the venom the second poisonous principle, bufagin, is found, but the chromaffin reaction shows very clearly that the first response of the toad to stimulation is the excretion, not of a mere diluent, but a strong solution of the most powerful poison at his command. This is what one would expect, since logically it is to the toad's advantage to eject the substance which will produce the most severe and immediate discomfort to his enemy.

When a gland has discharged its secretion it does not refill, but is replaced by a new one. Where does the new gland originate? Young poison-glands may, we believe, grow down directly from the epidermis, beginning, as do the ordinary mucous skin glands, as an epithelial bud from the stratum germinativum and pushing downward into the cutis, but this is not the common means of glandular regeneration.

Bristol and Bartelmez we have already quoted on the subject: "When the poison is discharged, the remains of the glands are resorbed, and at the same time one of the five or six undeveloped glands grouped around the mouth of the functioning gland grows down alongside the remains of the discharged gland, pushing it aside to occupy its former place." This is in brief exactly what occurs. The ducts of these huge parotid poison-glands are branched a short distance below the epidermal foveolae, smaller ducts leading off in an irregular ring radially and downward from the neck of the functioning gland, to which they have the same relation as the ribs to the rod of an umbrella. Each branch terminates in a young, developing poison-gland. Different stages of gland development may be observed in the group of young glands surrounding a single functioning one.

The shape of the immature glands is round or oval generally, but glands may be seen which are lobated or which are flattened on one side, and the young glands lie at different depths in the corial strata. We have not had an opportunity of studying embryonic material, but it would seem probable, from some of our adult specimens, that the glands of this type arise by downward budding from the epidermal stratum germinativum, in the same manner as do the ordinary small mucous glands of the skin. As a gland grows down into the depths of the corium other young glands bud from the stratum germinativum of the gland-duct or from the epidermis in its immediate vicinity (fig. 6), so that a small group of young glands is found in the corium about a central one or parent. Only one of such a group functions at a time. The gland carries with it, down into the corium, the outer loose layer of the connective tissue which around the acinus enlarges proportionately with the acinar growth and becomes the wide layer of loose connective tissue immediately surrounding the adult gland. In this downward course the corial melanophores are also dragged

along and the gland may very rarely push ahead of it a small portion of the stratum compactum of the skin for a short distance—which, however, it generally penetrates.

The structure of the young glands is, except for the glandular epithelium, exactly similar to that of the mature forms (figs. 4, 5, and 6). The gland-collar is not as long as in the adult state and the radial zones of epithelium have a thickness of but one cell each (fig. 6). The epithelium of the youngest gland is flattened cuboidal in type (fig. 5), the nucleus of each cell being close against the matrix of the gland-wall. The nuclei are oval in shape, stain very deeply, and have a dense chromatin network with many small chromatic knots. There is usually one large chromatic mass, probably a nucleolus. We have never seen one of these nuclei in mitosis, although cell division must occur and be fairly rapid during the growth of these glands. As the glands begin to push downward into the cutis, certain changes appear in the epithelial lining of the young acinus (figs. 4 and 5). Usually these changes do not occur simultaneously in all the cells of the gland, but rather the cells develop individually or in small groups of two or three. The cell which is coming to maturity and functioning enlarges tremendously, so that it may almost bridge the entire cavity of the gland acinus, and the once clear homogeneous protoplasm becomes reticulated, the reticular appearance being first noticeable at the cytoplasmic pole of the cell. The cells begin to show large numbers of small vacuoles; then the cytoplasm of these swollen cells begins to show large numbers of granules similar to the grains in the secretion of the mature gland, the granules being more dense in the inner part of the cell; soon the entire plasma seems to be converted into a mass of granules. While these cytoplasmic changes are going forward, the cells increase in height more and more, until they are very long columnar elements which gradually stream away into the acinus to form the granular secretion. These changes, as we have said, do not occur simultaneously in all the gland-cells. The first cells to show them are in the bottom or fundus of the acinus, those of the epithelium (near the junction of the acinus with the collar) being the last to be transformed into secretion. By the time that the gland has forced its way into the inner loose connective tissue layer of the corium all the epithelial cytoplasm has disappeared and the gland is lined only by the naked nuclei.

Such a gland can be distinguished in two ways from the mature poison-sac which represents the adult gland: it is smaller in size and it shows no reaction to chromates. Where, then, does the epinephrin content of the glandular venom come from? It is found only in the poison-glands when the gland reaches its full size. It is not found in any part of the young glands; the glandular epithelium never gives the chromaffin reaction, which is negative also in the small skin glands which have been classed as producers of mucus.

We must consider two possible methods of origin for this substance; first, an exogenous one, that the epinephrin is produced by the well-known chromaffin organs, the adrenal gland, etc., and carried to the poison-sacs via the blood or lymph. Against this hypothesis is the fact that we have no really reliable evidence of the presence of adrenalin in the general circulation of any animal. It is, of course, unlikely that so great an amount of epinephrin could be transported as such in the circulating fluid of the body, since the intravenous exhibition of a large amount of adrenin is in all animals productive of immediate death, and Abel and Macht have shown that the toad, while immune to bufagin, presents no such power of resistance against his own adrenalin. On the other hand, it is conceivable that the compound might be transported to the gland in the form of some mother substance and activated in the gland to form true epinephrin.

More probably the entire process of adrenalin synthesis is the work of the poison-gland itself and we can hypothesize the synthetic process as follows: During the destruction of

the glandular epithelium to make the venom, a mother substance is formed which is later activated in the mature gland-sac to the chromaphil adrenalin through the agency of the naked nuclei of the gland-wall. Most authors who have worked with poison-glands of Batrachia are of the opinion that the venom is the result of nuclear activity, since the cytoplasm of the gland-cells could never account for the amount of secretion in the mature gland or its increase after the cytoplasmic destruction leaves the wall of the gland, lined with naked nuclei alone. Madame Phisalix, who studied the glands of the salamander, describes the nuclei as actively engaged in the production of poison grains. It is not probable that the nuclei can produce the secretion entire, since in that case we might expect discharged glands to refill, as the naked nuclei seem uninjured in the expulsion of the secretion and there is no evidence that such refilling ever takes place, the emptied gland degenerating and being at once absorbed.

Unfortunately nothing is known about the origin of adrenalin in the organs in which it is commonly found and it is only recently that its chemical structure and position have been recognized. It is an aromatic amine base and its identification as such has stimulated the interest of investigators in other substances belonging to this group. Their work (pharmacological and chemical) has resulted in a fairly extensive knowledge of the origin, occurrence, and behavior of some of these compounds. In general, it may be said that these amine bases have a pressor effect on the circulation, and that the more nearly they are related chemically to adrenalin, the more closely they resemble it in their pharmacological effect on animals. In other words, in this group of compounds chemical and physiological similarity go hand in hand. They resemble each other also in another way, since it has been shown that different amin bases are derived in the same manner from closely related amino-acids. Recently some interesting facts have come to light about the origin of certain members of this class which we believe to be significant, and to have a distinct bearing on the question we have been considering, namely, the origin of epinephrin in the poison-glands of *Bufo aqua*.

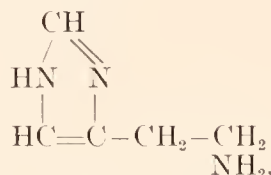
Barger and Walpole (1909) have isolated a poisonous pressor base *p*-hydroxyphenylethylamin, from putrefying horse meat, which is very closely related chemically and physio-

logically to epinephrin, $\text{HO} \begin{array}{c} \text{HO} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{---} \end{array} \text{CH (OH) CH}_2 \text{NH. CH}_3$.

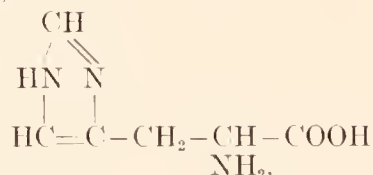
This base has the formula $\text{HO} \begin{array}{c} \text{---} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{---} \end{array} \text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{NH}_2$

and is derived from the amino-acid, tyrosin, $\text{HO} \begin{array}{c} \text{---} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{---} \end{array} \text{CH}_2 \text{CH (NH}_2\text{) COOH}$, one of the commonest products of protein decomposition, through the agency of certain putrefactive bacteria, which split off CO_2 from the tyrosin molecule. The same base is similarly formed from tyrosin by yeasts during the ripening of cheese, and Barger and Dale (1909) have obtained it from ergot and have shown that it is responsible for some of the physiological effects of that drug. Emerson (1902) found the substance in pieces of pancreas autolyzed under supposedly aseptic conditions and was able to increase the amount formed in his preparations by adding pure tyrosin to them, but Abderhalden (1909) was unable to confirm his results and it is probable that Emerson's material became in some way infected. Thus, *p*-hydroxyphenylethylamin is always produced in nature as a result of cellular activity from tyrosin, one of the end-products of protein decomposition.

Nor is the formation of *p*-hydroxyphenylethylamin an isolated example of the production by living cells of an amin base from an amino acid. Aekermann (1910) has shown that the poisonous base β -imidazoethyamin,



the exhibition of which results in all the symptoms of anaphylactic shock, is a derivative of the non-toxic acid histidin,



and that the change from acid to base is of the nature of a bacterial decarboxylation or splitting off of carbon dioxide from the acid molecule.

Very recently an important addition to our knowledge of animal poisons has been made by the work of Henze (1913), who studied chemically the venom of a cephalopod found in the Bay of Naples. This animal kills its prey (the crab) with a very powerful poison secreted by its salivary glands, the pressor principle of which was supposed to be a toxalbumin. Henze has proved, however, that this poison is none other than the same *p*-hydroxyphenylethylamin which Barger and his co-workers found in putrid meat. Its production from tyrosin by decarboxylation probably results, in these cephalopods, from the metabolic activity of the gland-cells themselves.

Now, since one of the aromatic amin bases, a virulent, poisonous pressor substance, can be derived from a harmless amino-acid by so simple a process as decarboxylation, resulting from glandular activity, it can not be considered an unreasonable supposition that another aromatic amin base, adrenalin, chemically and physiologically closely related, may be synthesized in the same way as Guggenheim (1913) first suggested from a related mother substance. And what would be more probable than that the mother substance of adrenalin in these glands be a compound of the same sort as tyrosin, the mother substance of *p*-hydroxyphenylethylamin (an amino acid) and that the change of that acid to the base adrenalin be accomplished also by a splitting off of CO_2 , as in the synthesis of the related amin base, perhaps through the activity of the naked nuclei of the glandular epithelium?

The common chromaffin organs of this particular toad present nothing remarkable for notice. The adrenal is of the type ordinarily found in the Anura, a long, narrow, irregular band of a bright golden yellow color on the ventral surface of the kidney. Sections show that the gland is an extremely vascular structure, built up of strands of cells, irregularly polygonal in shape, whose pale cytoplasm contains, near its center, a large round nucleus which stains deeply with hematoxylin. These cells are loaded (fig. 10) with masses of sudanophil lipid material, which the polariscope shows to be singly refractive. These cells, of course, represent the cortex of the mammalian adrenal. Irregularly interwoven among the cortical strands are masses or columns of cells loaded with chromaphil granules, so thickly as to obscure the cell nuclei. This medullary substance is sometimes round, in masses embedded in the cortical strands, but otherwise has no definite relation to the cortex.

It is impossible to say whether the total amount of chromaffin tissue is proportionately greater, or less, in this toad than in the other Anura, since the tissue is so widely distributed in the animal's body and since there is a tremendous individual variation in size in the adrenals, apparently depending somewhat on the size of the animal.

The cells of the sympathetic ganglia which contain chromaphil granules are arranged in irregular columns or cords, sharply separated from the clumps of ganglion cells by distinct bands of connective tissue (Fig. 9). They may be easily differentiated microscopically by their characteristic nuclei, even in material which has been fixed in fluids which do not contain chromates. The cells are large and irregularly polygonal; the cytoplasm is less densely packed with chromaphil granules than is the case in the corresponding cells in the adrenal medulla (fig. 9). The nuclei, which are always eccentric in position, are oval in shape and stain deeply with hematoxylin and other basic dyes. The chromatin network is made up of very fine threads and the nucleus usually contains one or more deeply staining chromate masses, probably net-knots. The nuclei are usually at least twice the size of the nuclei of the connective-tissue cells of the ganglion or the cells of the nerve-fiber sheaths and they are of course much smaller than the nuclei of the nervous remnants of the ganglion. An occasional chromaffin cell may be found in the ganglia of the intestinal sympathetic plexuses and in the testes, but we have failed to find any cell-nests in the walls of the blood-vessels or any abdominal chromaffin bodies or paraganglia.

The tubular epithelium of the kidneys of *Bufo aqua* show a curious pigmentation which is very confusing in sections of chromate-fixed material, since the color is exactly that of chromaffin granules in other cells. Its presence, however, in tissue which has been fixed in formalin shows that it has nothing to do with adrenalin. It is doubly refractile and represents probably pigmented material filtered from the blood by the tubular epithelium. We have made no attempt to investigate its nature.

The secretion of the poison-glands of *Bufo lentiginosus* is also stained brown by salts of chromic acid, but adrenalin has not been isolated from these glands and the chromaffin reaction does not necessarily indicate the presence of this drug. Wiechowski, who has studied the toads which are found in Bohemia, has not been able to isolate epinephrin from the secretion of their poison-glands, in spite of the fact that this secretion is chromophil. (Wiechowski, 1914.)

SUMMARY.

To sum up the results of these investigations on the cutaneous glands of the tropical toad *Bufo aqua*, we can say that they may be divided physiologically by the nature of their secretion into (1) adrenalin producers, and (2) those whose secretion contains none of that compound. The adrenalin-producing acini are limited to the glandular masses behind the eye and surrounding the tympanum, known as the "parotid" glands, the chromaffin reaction being negative in all other cutaneous glands. The contents of the poison-glands having been discharged, probably through the agency of the contraction of a smooth muscular coat surrounding the gland acinus in response to a stimulus of sufficient strength, the emptied sac does not refill, but is resorbed, and its place taken by an immature gland of the same type. These young glands bud from the duct or neck of the older gland-sac, about which a ring of them may be found. In the process of maturation they grow downward through the various strata of the cutis vera, carrying with them in their descent a layer of tissue from the outer loose layer of the derma, and are surrounded by it during their existence. The secretion of these poison-glands is produced by and during the destruction of the cytoplasm of epithelial elements lining the acinus of the young gland, which destruction leaves only a cell nucleus within the acinar wall.

Two sorts of secretion occur in the lumen of the mature poison-gland: (1) a granular secretion, which is the first to be formed, and which is found filling the entire lumen of the young glands and is located in the central part of the mature acini; (2) a clear, homogeneous or finely punctate fluid filling the periphery of the lumen, which takes on a bright yellow color after fixation in fluids containing chromates. This chromaphil secretion is not found in the young glands, nor does it ever occur in cutaneous glands in other parts of the body. As the gland grows older without being used, the chromaphil secretion diffuses into the central part of the gland, so that the entire venom stains yellow when treated with chromate-containing solutions. The homogeneous liquid is the first of the gland secretion to reach the skin surface when the gland discharges in response to a stimulus, probably because it is less viscous than the granular secretion, and its appearance is followed by the ejection of the first or granular emulsion in the center of the gland. In this way the adrenalin component of the gland venom is the first poison to reach the mucous membranes of an attacking animal.

The adrenalin content of the venom is not secreted as such by the glandular epithelium, since at no time in their life history do the epithelial cells show any yellowing after treatment with chromate solutions, nor does the poison-sac contain chromaphil material until long after the disappearance of all epithelial elements. The adrenalin is probably the result of a change produced in a mother substance, which is very likely an amino-acid, as Guggenheim first suggested, through the action of the naked nuclei of the old epithelial cells which remain attached to the inner surface of the wall of the poison-sac.

Analogous examples of like processes occurring elsewhere in nature lead us to believe that the change in question may be a process of decarboxylation, which results in the formation of this aromatic amin base from a corresponding acid.

We have no clue to the origin of this hypothetical amino-acid, but such an acid might readily be a result of the breaking down of the cellular elements of the gland, since many amino acids are derivatives of protein destruction. The granular secretion would appear to be formed directly in the cytoplasm of the gland-cells during their most active period of swelling and breaking down.

The chromaffin organs of the body (adrenal, medulla, etc.) do not appear to influence or be influenced by the presence of these cutaneous depots of adrenalin.

BIBLIOGRAPHY.

- ABDERHALDEN, E. 1909. Lehrbuch d. physiol. Chemie. Berlin, 2d ed., 353.
- ABEL, J. J., and D. J. MACHT. 1911. The poisons of the tropical toad *Bufo aqua*. Journ. Amer. Med. Assn., May 27, vi, 1531-36.
- 1912. Two crystalline pharmacological agents obtained from the tropical toad *Bufo aqua*. Journ. Pharmacol. and Exper. Ther., iii, No. 3, Jan., 319-377.
- ACKERMANN, D. 1910. Ueber den bakteriellen Abbau des Histidins. Zeitschr. f. physiol. Chemie, LXV, 505.
- BARGER, G., and G. S. WALPOLE. 1908. Isolation of the principles of putrid meat. Journ. Physiol., 1909, XXXVIII, 343.
- BARGER, G., and H. H. DALE. 1909. Ueber Mutterkorn. Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol., LXI, 113.
- BRISTOL, C. L., and G. W. BARTELMER. 1908. The poison glands of *Bufo aqua*. Science, XXVII, No. 690, 455.
- BUDGETT, J. S. 1899. Notes on the Batrachians of the Paraguayan Chaco, with observations on their breeding habits and development, especially with regard to *Phylomedusa hypochondrealis* Cope; also a description of a new genus. Quart. Journ. Microsc. Sc., 42, 305-334.
- CALMELS, G. 1883. Etude histologique des glandes a venin du crapaud, et recherches sur les modifications apportées dans leur évolution par l'excitation électrique de l'animal. Arch. de Phys., Tome 1, 3^e series, 326-62.
- CURRENT COMMENT. 1914. Hydroxyphenylethylamin—An animal poison. Journ. A. M. A., LXII, No. 1, 46.
- EMERSON, R. L. 1902. Ueber das Auftreten von Oxyphenyläthylamin bei Pankreasverdauung und über Fermentative CO₂ Abspaltung. Beitr. Chem. Physiol. u. Path., 1, 501-506.
- ESTERLY, C. O. 1904. The structure and regeneration of the poison glands of *Plethodon*. Univ. of Cal. Pub. Zool., 1, No. 7, 227-265.
- GUGGENHEIM, M. 1913. Proteinogene Amine. Therapeutische Monatshefte. Bd. 27, 508.
- HENZE, N. 1913. p. Oxyphenyläthylamin, das Speicheldrüsengift der Cephalopoden. Zeitschr. f. physiol. Chem., XXXVII, 51.
- HOOKE, DAVENPORT. 1914. Amoeboid movements in the corial melanophores of *Rana*. Amer. Journ. Anat., 16, No. 2, 237-250.
- MURSE, E. F. 1909. The cutaneous glands of common toads. Amer. Journ. Anat., ix, 321-360.
- SEECK, O. 1891. Ueber die Hautdrüsen einiger Amphibien. Dorpat. Inaug. Dissert.
- WEISS, O. 1898. Ueber die Hautdrüsen von *Bufo cinereus*. Arch. für. mikr. Anat., Bd. 4243, 405-423.
- WIECHOWSKI, W. 1914. Ueber Krötegift. "Lotos," Bd. 62, 1-3.

EXPLANATION OF PLATES.

KEY TO FIGURE REFERENCES.

<i>d. g.</i> , developing glands.	<i>a. s.</i> , layer of epinephrin containing secretion.	<i>r.</i> , melanophores.
<i>m. g.</i> , mucous glands.	<i>m.</i> , muscular layer.	<i>e. b.</i> , vertical bundles of connective-tissue fibers.
<i>deg.</i> , glands undergoing absorption.	<i>e. p.</i> , epidermis.	<i>c. n.</i> , chromaffin cells.
<i>p. g.</i> , parotid gland.	<i>o. l.</i> , outer loose layer of the cutis.	<i>gang.</i> , sympathetic ganglion cells.
<i>b.</i> , batteries of mature glands.	<i>s. c.</i> , stratum compactum cutis.	<i>v. c.</i> , vena cava.
<i>n.</i> , gland duct.	<i>i. l.</i> , inner loose layer of the cutis.	<i>a. c.</i> , inter-renal system.
<i>g. c.</i> , gland collar.	<i>i.</i> , zone of the inner loose layer of the cutis about the gland acinus.	<i>a. m.</i> , adrenal system.
<i>g. a.</i> , gland acinus.		
<i>s. n.</i> , secreting nuclei.		
<i>g. s.</i> , granular secretion.		

PLATE I.

- FIG. 1. *Bufo aqua*, photograph of an adult male, showing the variation in tone of the ventral and dorsal integument, and the warty appearance of the animal. The huge parotid glands (*pg.*) are shown behind the tympanum and the pits into which the gland-ducts open are easily visible.
- FIG. 2. Section through the parotid gland of an adult male toad (*B. aqua*). Photomicrograph. $\times 10$. The picture shows four mature gland acini lying embedded in the inner loose stratum of the corium and the depth of the cutis vera caused by their presence. These glands are full of secretion, ready for discharge. At the extreme left of the picture are the remains of an old discharged gland which is rapidly undergoing resorption. The thickening of the cutis is entirely due to an hypertrophy of the inner loose layer.
- FIG. 3. Section through the parotid glands to show the arrangement of the connective-tissue fibers in the cutis vera. Celloidin-iron hematoxylin stain. Photomicrograph. $\times 20$. The photograph shows the division of the cutis into three layers, the outer loose layer lying just beneath the epidermis and separated from the inner loose layer by the stratum compactum. The honeycomb arrangement of the inner loose layers is very plain, two layers of horizontal fibers above and below the gland acini, which are connected by bundles made of vertical fiber strands. In the plane dividing the outer loose layer from the stratum compactum lie the corial melanophores (2). The three glands shown in this picture (*d. e. g.*) have been partially emptied and one of them is undergoing resorption.

- FIG. 4. Vertical sections through the duct of a mature poison-gland—celloidin-iron hematoxylin. Photomicrograph. $\times 120$. To show the manner of glandular regeneration. The gland-duct is shown emptying into a pit or foveolus on the skin surface. The duct is surrounded by a ring of young glands which have budded off from the duct epithelium. The section is cut directly through the duct of one of these young glands, the lumen of which can be seen communicating with the lumen of the duct leading into the mature acinus. The young glands are embedded in the compact layer of the cutis, but they, as well as the duct of the old gland, are surrounded by connective tissue derived from and directly continuous with the outer loose layer. The lining epithelium of these young poison-glands is still intact and the secretion has not yet begun to form.
- FIG. 5. Vertical section through the parotid gland showing young poison-glands. Photomicrograph. $\times 120$. The young glands in this section are of the adrenalin-containing variety and are in the earliest stages of secretory activity. The swelling of the glandular epithelium preparatory to its disintegration to form the granular secretion has just begun in some and is well under way in others. The small gland nearest the surface epithelium is the youngest stage. On one side of the acinus the gland epithelium is still low cuboidal in type, while on the other side the cells have swollen and have become vacuolated. The same change has occurred in the alveolar fundus of the left-hand gland of the pair below, while its fellow on the right shows swelling of the entire epithelium with beginning vacuolation and disintegration.
- FIG. 6. Vertical section through the parotid region. Celloidin-iron hematoxylin stain. Photomicrograph. $\times 100$. A young poison-gland which has grown down from the surface epithelium through the compact stratum of the derma. The plasma of the gland epithelium has broken down entirely and the gland is now merely a sac filled with a granular secretion and lined by naked nuclei which are seen in groups along the inner side of the gland-wall. The epithelium of the collar and duct is only two cells thick. There is no trace of any chromaffin material in the secretion of such a gland. Already a small gland and duct have budded off from the duct of the larger one and two of the epithelial cells of the tiny sac have swollen and taken on a high columnar form preparatory to the evolution of secretion.

PLATE II.

- FIG. 7. Section through the acinus and duct of a mature poison-gland. Fixed in formol bichromate-celloidin-Mallory's stain. Freehand drawing, about $\times 100$. The secretion in the lumen of this gland shows the yellow color of a brilliantly positive chromaffin reaction. The homogeneous fluid about the periphery of the gland acinus gives the reaction most strikingly, but in this gland, which is evidently an old one, the epinephrin-containing fluid has diffused through the granular material in the center of the acinus and the entire secretion contains some of the chromate-reducing material (epinephrin). This gland has about its duct a number of young glands growing downward into the inner loose layer of the cutis. The stratum compactum cutis appears as a dense blue mass. This particular section shows very well the dragging down of the corial melanophores by the gland as it carries with it, in its downward growth, a sheath from the outer loose layer of the cutis.
- FIG. 8. High-power drawing of the wall of a mature poison-sac. Tissue fixed in formol bichromate-celloidin-hematoxylin and eosin. Freehand drawing. Leitz ocular No. 3 and objective 7. Tube length 160 mm.; about $\times 400$. The gland-wall is surrounded by a loose network of very fine fibers derived from the outer loose stratum of the corium (*i*). The naked nuclei lining the gland-sac are covered over by the deeply stained chromophil secretion (*a. s.*) which lies immediately within the gland-wall. The reticular appearance of the secretion lying next the muscle is probably due to precipitation of albuminous material during fixation. The secretion has also injected the spaces between the fibers of the circular muscle layer about the gland (*m.*) and shows the arrangement of the matrix in which the fibers are embedded.
- FIG. 9. Section of a sympathetic ganglion of *Bufo aqua*. Fixation, staining, and treatment as in fig. 8. This section shows cords of chromaffin cells with small, deeply-staining nuclei and granular cytoplasm (*Cr.*) sharply separated by broad connective-tissue bands from the masses of large ganglion cells (*gang.*) and nerve fibers.
- FIG. 10. Section of the adrenal body of *Bufo*. Tissue fixed in formol-bichromate. Frozen section counterstained with Sudan III. Drawn freehand. Zeiss ocular No. 5 and objective 16 mm. Tube length 160 mm. About $\times 300$. This section shows the typical adrenal body of the Anura. The interrenal cells are laden with sudanophil lipid. They do not form any definite pattern with the cords of adrenal substance (*a. m.*), but the two cell-types mingle. The green color of the chromophil material in the adrenal substance results from an attempt to stain these sections with Giemsa's stain.



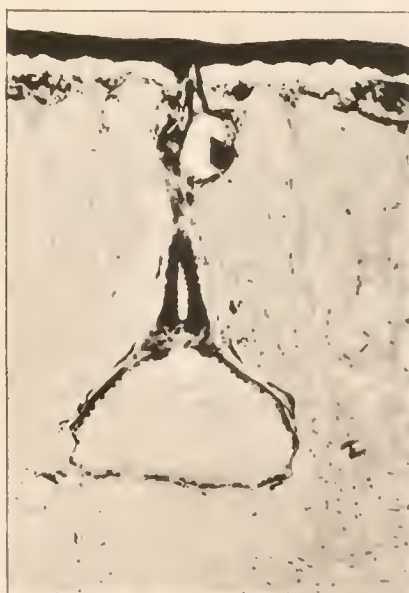
1



2



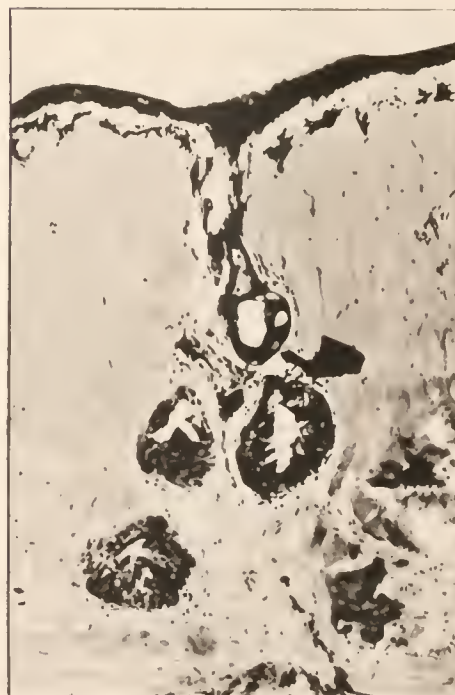
3



4



5



6

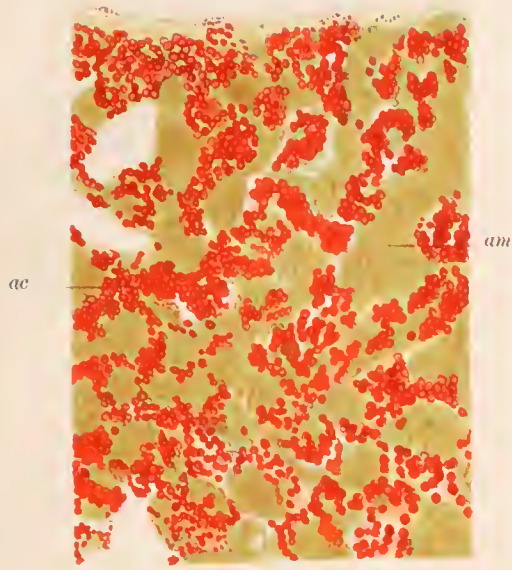


FIG. 10



FIG. 9

cr



FIG. 7



FIG. 8

MBL WHOI LIBRARY



WH 1863 Y

1 272

